

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**O SISTEMA NORADRENÉRGICO NOS MECANISMOS DE  
EXTINÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS  
AVERSIVAS**

**ALUNO: FABRICIO HOFFMANN MARTINS DO MONTE**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M772s Monte, Fabrício Hoffmann Martins do

O sistema noradrenérgico nos mecanismos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas [tese] / Fabrício Hoffmann Martins do Monte, orientador, Antônio de Pádua Carobrez. - Florianópolis, SC, 2010.

93 p.: il., tabs., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Sistema noradrenérgico. 3. Extinção. 4. Reconsolidação. 5. Memória aversiva. 6. Condicionamento olfatório. 7. Medo contextual. 8. Transtornos de Estresse Pós-Traumáticos. 9. Ratos. 10. Córtex pré-frontal. I. Carobrez, Antonio de Pádua. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

**O sistema noradrenérgico nos mecanismos de extinção e  
reconsolidação de memórias aversivas.**

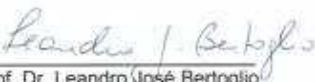
POR

Fabício Hoffmann Martins do Monte


Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos  
membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores  
Doutores:

  
Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez  
Presidente – FMC/UFSC

  
Prof. Dr. Reinaldo Naito Takahashi  
FMC/UFSC

  
Prof. Dr. Leandro José Bertoglio  
FMC/UFSC

  
Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes  
USP/RP

  
Prof. Dr. Victor Molina  
UNIC/AR



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela oportunidade cedida em seu laboratório, por sua orientação, sugestões e idéias e, principalmente, pela sua amizade neste início da minha caminhada científica;

A todos os professores do Departamento de Farmacologia que me concederam seus ensinamentos durante estes anos;

Em especial, ao Prof. Dr. Jamil Assreuy; as amigas doutorandas Regina de Sordi, Grasiela Kincheski e Eloisa Pavesi; e as alunas de intercâmbio Melody Allensworth e Ting Wong pela ajuda na realização de parte dos meus experimentos;

A todos os colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental ou que por aqui passaram: Carol, Cris Mochny, Cris Stern, Elô, Grasi, Ju Kroon, Ju Cavalli, Paulo e Taiane pelo apoio nas tarefas experimentais e pelo companheirismo nestes anos;

Ao amigo Xima pela amizade e parceria nas horas de trabalho; e pelas brincadeiras e distrações nas horas de lazer;

Aos demais colegas da pós-graduação e aos funcionários do departamento por não medirem esforços em me ajudar ou prestar favores;

Aos meus parentes e amigos pelos elogios que me fortaleceram e pelas boas recepções quando eu retornava para casa;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.



**“Sem dizer palavra, sem imaginar nada, com o infinito amor na alma que tudo quer, vou longe, muito longe.”**

Arthur Rimbaud (1854-1891), poeta francês.





## RESUMO

Estudos têm demonstrado que a ativação do sistema noradrenérgico após situações de estresse reforça a formação de memórias aversivas. Assim sendo, antagonistas beta- e alfa-1-adrenérgicos têm sido amplamente utilizados em pacientes com transtornos de ansiedade associados com a recorrência de memórias aversivas, como o transtorno de estresse pós-traumático. Nos últimos anos, o paradigma do medo condicionado em ratos tem servido como ferramenta para compreender os mecanismos envolvidos na atenuação do comportamento de defesa após situações traumáticas. Desta forma, o presente estudo utilizou o condicionamento de medo contextual ou olfatório para avaliar os efeitos da administração de compostos noradrenérgicos, respectivamente sobre os mecanismos de extinção e reconsolidação do medo. Ratos foram treinados em uma caixa de condicionamento contextual (1 choque, 1 mA, 2 s). Os animais foram re-expostos ao aparato por três dias consecutivos durante os quais receberam uma administração intraperitoneal (IP) única (1 dia) ou repetida (3 dias) de salina (controle), isoproterenol (agonista beta-adrenérgico - 1; 2,5 e 5 mg/Kg), propranolol (antagonista beta-adrenérgico - 5; 10 e 20 mg/Kg) ou prazosin (antagonista alfa-1-adrenérgico - 0,1; 0,5 e 1,5 mg/Kg), trinta minutos antes (aquisição da extinção) ou imediatamente após (consolidação da extinção) cada sessão de extinção (10 minutos). No último dia, os animais foram avaliados sem o efeito de drogas. A porcentagem do tempo de congelamento foi utilizada como índice de retenção de memória ao longo das sessões de extinção. Considerando o papel chave do córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) nos mecanismos de extinção, um estudo imunoistoquímico avaliou a participação desta estrutura na extinção do medo condicionado contextual. Em seguida, os efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle), isoproterenol (10 e 40 nmol), atenolol (antagonista beta-1-adrenérgico seletivo), atenolol mais isoproterenol (10 minutos de intervalo) ou prazosin (0,75 e 2,5 nmol) foram avaliados durante as sessões de extinção. Os resultados demonstraram efeitos semelhantes após a administração sistêmica repetida ou intra-CPFvm dos compostos noradrenérgicos, sugerindo que os efeitos sistêmicos observados possam estar sendo mediados por esta estrutura. Enquanto a ativação dos receptores beta-adrenérgicos facilitou os mecanismos de extinção; o bloqueio dos receptores beta- e alfa-1-adrenérgicos prejudicou estes processos. Em uma etapa posterior, os efeitos da injeção intraperitoneal

de salina, propranolol (10 e 20 mg/Kg) ou prazosin (0,5 e 1,5 mg/Kg) sobre os mecanismos de reconsolidação foram avaliados através de um protocolo de condicionamento olfatório. Neste estudo, os animais foram treinados na caixa de condicionamento (5 choques, 0,4 mA, 2 s, 40 s intervalo) na presença de um estímulo olfatório (amilacetato). No dia seguinte, os mesmos retornaram ao aparato para uma sessão de reativação da memória (2 min; sem choque; com odor). Os tratamentos foram efetuados imediatamente após esta sessão e a fase de teste (caixa de odor) foi realizada uma semana após, na presença do estímulo olfatório condicionado. Uma redução da resposta defensiva (caracterizada por uma redução do tempo escondido e um aumento no tempo e no número de aproximações a fonte de odor) foi observada durante o teste nos grupos tratados com ambas as doses de prazosin, mas não nos animais que receberam o mesmo tratamento e não foram reativados, sugerindo um efeito amnésico desta droga sobre os mecanismos de reconsolidação do medo condicionado olfatório. O mesmo efeito foi visualizado após a microinjeção direta de prazosin (1,5 nmol) no CPFvm, demonstrando um envolvimento dos receptores alfa-1-adrenérgicos desta estrutura nos processos de reconsolidação de memórias aversivas.

## ABSTRACT

Studies have described that stress-related noradrenergic system activation strengthens the formation of aversive memories. For this reason, beta- and alpha-1-adrenergic blockers have successfully been used in the last years to treat anxiety disorders related to aversive memories recurrence, such as post-traumatic stress disorder. In the last years, the conditioned fear paradigm in rats has been used to better understand the mechanisms involved in the attenuation of defensive behavior after a traumatic situation. Thus, the present study used the contextual or the olfactory fear conditioning to evaluate the effects of noradrenergic compounds administration, respectively in the mechanisms of fear extinction and reconsolidation. Rats were previously paired in a contextual fear conditioning box (1 footshock, 1 mA, 2s duration), further returning to the same box during 3 consecutive days receiving a single (1 day) or repeated (3 days) intraperitoneal injection of saline (control), isoproterenol (beta-adrenergic agonist; 1, 2.5 and 5 mg/Kg), propranolol (beta-adrenergic antagonist; 5, 10 and 20 mg/Kg), or prazosin (alpha-1-adrenergic antagonist; 0.1, 0.5 and 1.5 mg/Kg), thirty minutes before (acquisition of extinction) or immediately after (consolidation of extinction) each extinction session (ten minutes). On the last day, all animals were re-exposed undrugged to the apparatus. The time percentage of freezing along the sessions was used as index of memory retention. Since the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) has been described as a key structure in the modulation of extinction, an immunohistochemical study investigating the role of this structure in the contextual fear extinction was further performed. Following, the effects of intra-vmPFC injection of PBS (control), isoproterenol (10 and 40 nmol), atenolol (10 and 40 nmol), atenolol plus isoproterenol (10 minutes apart), or prazosin (0.75 and 2.5 nmol) were evaluated during the extinction session. The results demonstrated similar effects after the systemic or intra-vmPFC administration of noradrenergic compounds, suggesting that the systemic effects observed may be being mediated by this structure. While the beta-adrenergic receptors activation facilitated the extinction mechanisms; the blockade of beta- or alpha-1-adrenergic

receptors impaired this process. In a subsequent stage, we observed the effects of saline, propranolol (10 and 20 mg/Kg) or prazosin (0.5 and 1.5 mg/Kg) administration in the reconsolidation of olfactory fear conditioning. In this study, animals were trained in the conditioning box (5 footshocks, 0.4 mA, 2 s, 40 s interspaced) in the presence of an olfactory stimulus (amylacetate). In the next day, the subjects returned to the apparatus in a reactivation sessions (2 min with odor, no footshock). Treatments were made immediately after this session and the test phase (odor box) was performed one week later, in the presence of the olfactory conditioned stimulus. A decrease in the defensive response (characterized by a reduction in the hide time and an increase in the time and number of approach to the odor source) was observed during the test in the groups injected with both doses of prazosin, but not in the non-reactivated animals that received the same treatment, suggesting an amnesic effect of this drug in the reconsolidation of olfactory fear conditioning mechanisms. This same effect was visualized after the direct microinjection of prazosin (1.5 nmol) into the vmPFC, demonstrating an involvement of vmPFC- $\alpha$ -1-adrenergic receptors in the reconsolidation of aversive memories.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> . Representação esquemática das diferentes etapas envolvidas durante o processamento da memória.....	4
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática mostrando (A) a caixa de condicionamento e (B) a caixa de odor.....	22
<b>Figura 3.</b> A) Avaliação do efeito antagonista da injeção sistêmica aguda ou B) repetida de propranolol sobre o aumento da frequência cardíaca induzido por doses crescentes de isoproterenol em ratos anestesiados; C) Parâmetros basais de frequência cardíaca após três dias de tratamento com propranolol, isoproterenol ou salina.....	30
<b>Figura 4.</b> Avaliação do efeito antagonista da injeção sistêmica aguda (A) ou repetida (D) de prazosin sobre o aumento da pressão arterial induzido por doses crescentes de fenilefrina em ratos anestesiados. Parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca avaliados durante o quarto dia, sem a injeção de drogas, após o tratamento agudo (B,C) ou repetido (E,F) com prazosin ou sal.....	31
<b>Figura 5.</b> A) Efeitos da administração aguda de salina, isoproterenol ou propranolol 30 minutos antes da sessão de extinção 1 (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos; B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....	33
<b>Figura 6.</b> A) Efeitos da administração repetida de salina, isoproterenol ou propranolol 30 minutos antes das sessões de extinção 1, 2 e 3 (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos; B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....	35
<b>Figura 7.</b> A) Efeitos da administração repetida de salina, isoproterenol ou propranolol, imediatamente após as sessões de extinção 1, 2 e 3 (consolidação da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos; B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....	36
<b>Figura 8.</b> Efeitos da injeção sistêmica de compostos beta-adrenérgicos na expressão de proteína Fos no CPFvm durante a extinção do medo	

condicionado contextual nos grupos controle e tratados com salina, propranolol ou isoproterenol, 30 minutos antes das sessões de extinção 1, 2, e 3, durante a primeira e a quarta sessão de extinção.....38

**Figura 9.** A) Efeitos da administração repetida de veículo ou prazosin, 30 minutos antes das sessões de extinção 1, 2 e 3 (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....40

**Figura 10.** A) Efeitos da administração repetida de veículo ou prazosin, imediatamente após as sessões de extinção 1, 2 e 3 (consolidação da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos; B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....41

**Figura 11.** Avaliação do efeito da microinjeção de atenolol, escopolamina e AP5 no córtex pré-frontal ventro medial nos comportamentos de ansiedade e de memória incondicionadas.....43

**Figura 12.** A) Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS, isoproterenol ou atenolol, imediatamente após a primeira sessão de extinção (consolidação da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante dois dias consecutivos; B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....44

**Figura 13.** A) Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS ou prazosin, dez minutos antes da primeira sessão de extinção (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante dois dias consecutivos; B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção.....46

**Figura 14.** Efeitos da injeção sistêmica de veículo, prazosin ou propranolol, imediatamente após a sessão de reativação (fase de reconsolidação), na expressão do medo condicionado olfatório avaliado sete dias após na caixa de odor. Os parâmetros comportamentais: porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido, número de aproximações e tempo de head-out foram

registrados por dez minutos durante as sessões de familiarização (sem odor presente) e teste (odor condicionado presente) e posteriormente analisados.....,49

**Figura 15.** Efeitos da microinjeção intra-CPFdm de PBS ou prazosin, imediatamente após a sessão de reativação (fase de reconsolidação), na expressão do medo condicionado olfatório avaliado sete dias após na caixa de odor. Os parâmetros comportamentais: porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido, número de aproximações e tempo de head-out foram registrados por dez minutos durante as sessões de familiarização (sem odor presente) e teste (odor condicionado presente) e posteriormente analisados.....50

**Figura 16.** Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS ou prazosin, imediatamente após a sessão de reativação (fase de reconsolidação), na expressão do medo condicionado olfatório avaliado sete dias após na caixa de odor. Os parâmetros comportamentais: porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido, número de aproximações e tempo de head-out foram registrados por dez minutos durante as sessões de familiarização (sem odor presente) e teste (odor condicionado presente) e posteriormente analisados.....51





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – análise de variância

AP - anteroposterior

ATP – trifosfato de adenosina

b.p.m. – batimentos por minuto

CPF – córtex pré-frontal

CPFm – córtex pré-frontal medial

CPFvm – córtex pré-frontal ventromedial

CPFdm – córtex pré-frontal dorsomedial

DV - dorsoventral

EC – estímulo condicionado

EI – estímulo incondicionado

e.p.m. – erro padrão da média

EV - endovenoso

FC – frequência cardíaca

IP – intraperitoneal

mA - miliamper

ML - mediolateral

mmHg – milímetros de mercúrio

NMDA – N-Metil-D-Aspartato

NaCl – cloreto de sódio

PA – pressão arterial

PBS – salina tamponada

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

UI – unidades internacionais

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Transtorno de Estresse Pós-Traumático .....	1
1.2 A extinção de memórias aversivas como terapia para o TEPT.....	1
1.3 Modelos animais para o estudo dos mecanismos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas.....	2
1.4 Fronteiras entre os mecanismos de extinção e reconsolidação.....	3
1.5 Características comportamentais e teorias cognitivas da extinção.....	4
1.6 Características comportamentais e teorias cognitivas da reconsolidação.....	5
1.7 Sistemas neurais envolvidos no TEPT.....	7
1.8 Bases neuroanatômicas dos mecanismos de extinção.....	8
1.9 Bases neuroanatômicas dos mecanismos de reconsolidação.....	10
1.10 Tratamentos farmacológicos para o TEPT.....	12
1.11 Características farmacológicas dos receptores adrenérgicos.....	12
1.12 O sistema noradrenérgico em foco no tratamento do TEPT.....	15
1.13 A neurotransmissão noradrenérgica na formação de memórias aversivas.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Drogas.....	18
3.3 Monitoramento Cardíaco.....	19
3.4 Modelos Experimentais.....	19
3.4.1 Caixa de Condicionamento.....	19
3.4.2 Caixa de Odor.....	19
3.5 Cirurgia estereotáxica.....	21
3.6 Microinjeção Intracerebral.....	22
3.7 Procedimentos.....	23
<u>Experimento 1: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica aguda ou repetida de compostos</u>	

<i>adrenérgicos.....</i>	<i>23</i>
<i><u>Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica aguda de propranolol, isoproterenol ou salina na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.....</u></i>	<i>24</i>
<i><u>Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica repetida de propranolol, isoproterenol ou salina nas fases de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.....</u></i>	<i>24</i>
<i><u>Experimento 4: Avaliação imunoistoquímica da expressão de proteína Fos no CPFvm nos grupos controle e tratados com salina, propranolol ou isoproterenol antes da sessão de extinção.....</u></i>	<i>24</i>
<i><u>Experimento 5: Efeitos da administração sistêmica repetida de prazosin ou veículo na fase de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.....</u></i>	<i>26</i>
<i><u>Experimento 6: Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS, atenolol ou isoproterenol na fase de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.....</u></i>	<i>26</i>
<i><u>Experimento 7: Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS ou prazosin na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.....</u></i>	<i>26</i>
<i><u>Experimento 8: Efeitos da administração sistêmica aguda de propranolol, prazosin ou salina durante a fase de reconsolidação do medo condicionado olfatório.....</u></i>	<i>27</i>
<i><u>Experimento 9: Efeitos da microinjeção de PBS ou prazosin nas porções dorsal e ventral do CPFm durante a fase de reconsolidação do medo condicionado olfatório.....</u></i>	<i>28</i>
<i>3.8 Perfusão e Histologia.....</i>	<i>28</i>
<i>3.9 Análise Estatística.....</i>	<i>28</i>
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>86</b>

## INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade no homem têm sido um dos grandes problemas de saúde nas últimas décadas. Em geral, o risco aumentado para a ocorrência destes transtornos tem sido associado a exposições prévias a eventos traumáticos como guerras, terrorismo, seqüestros, assaltos, violência sexual, acidentes, catástrofes naturais e uma ampla variedade de outros traumas (Feldner et al 2007; Heim & Nemeroff 2009). Enquanto grande parte da população é capaz de lidar com situações extremas de estresse sem maiores consequências psicológicas, uma pequena, porém significativa parcela, falha ao tentar superar tais experiências traumáticas. Estes indivíduos passam a desenvolver um transtorno denominado transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), no qual há uma exacerbação das respostas fisiológicas e comportamentais de defesa, como resultado da recorrência duradoura do trauma consolidado como uma memória aversiva (Yehuda & LeDoux 2007).

### 1.1. Transtorno de Estresse Pós-Traumático

Um estudo realizado pelo Instituto Nacional de Saúde Mental (NIMH – National Institute of Mental Health) dos Estados Unidos revelou que o TEPT tem uma incidência de 3,6% ao ano, com uma prevalência de 1,9% da população. Isto implica dizer que cerca de 5,2 milhões de pessoas naquele país são acometidas por este transtorno de ansiedade (Kessler et al 2005). Em adição, pacientes com TEPT apresentam frequentemente co-morbidades com outros quadros psiquiátricos, tais como: depressão maior, outros transtornos de ansiedade e dependência a drogas de abuso (Kessler et al 1995; Zatzick et al 1997); além de uma baixa qualidade de vida (Zatzick et al 1997).

Em geral, os sintomas normalmente evidenciados durante o curso do TEPT: distúrbios de sono, ocorrência de pesadelos, irritabilidade, vigilância excessiva, hiperexcitação, dificuldade de concentração, sentimentos de indiferença e perda de interesse (American Psychiatric Association, 2000), parecem estar diretamente associados com a revivência constante das memórias aversivas que perduram e reverberam por um longo período após a retirada do evento estressor (Nemeroff et al 2006).

## ***1.2. A extinção de memórias aversivas como terapia para o TEPT***

O TEPT tem sido compreendido como uma patologia na qual a exposição a um evento excessivamente ameaçador, ou a uma série de situações traumáticas, estaria conduzindo o indivíduo a uma resposta condicionada de medo. Sabe-se que a apresentação repetida a estímulos específicos como sons, odores, objetos ou lugares previamente associados com o evento traumático, na ausência de consequências negativas, promove uma atenuação das memórias aversivas, reduzindo assim a resposta condicionada (Foa et al, 2000).

Por esta razão, uma intervenção terapêutica efetiva utilizada nos últimos anos para o tratamento do TEPT tem sido realizada através da terapia de exposição (Cloitre 2009), associada ou não ao uso de medicamentos, como tentativa de extinguir as memórias traumáticas, abolindo consequentemente os sintomas presentes (McNally 2007; Rothbaum & Davis 2003).

## ***1.3 Modelos animais para o estudo dos mecanismos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas***

Grande parte do conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos nos processos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas, deve-se aos estudos com condicionamento clássico aversivo, amplamente utilizado em animais de laboratório por diversos grupos de pesquisadores em todo mundo (Barad 2005; Cammarota et al 2005; Myers & Davis 2007). Neste paradigma, um estímulo inicialmente neutro (ex. um som, um odor ou um ambiente) adquire propriedades aversivas após ter sido corretamente associado (durante a fase de treino) com um estímulo incondicionado (EI) ou biologicamente relevante (ex. choque elétrico). Quando devidamente pareados, os animais passam a exibir comportamentos defensivos após a exposição isolada do estímulo neutro (durante a fase de teste), agora designado estímulo condicionado (EC).

Esta capacidade de adquirir uma nova informação mediante uma experiência é denominada aprendizagem (aquisição) e trata-se da etapa inicial do processo que envolve a formação de uma memória. Esta fase é sucedida por um período de consolidação, o qual envolve a seleção e o armazenamento da informação adquirida. A simples observação de aspectos anatômicos, bioquímicos ou eletrofisiológicos não permite detectar a presença de uma memória. No entanto, durante uma etapa de evocação, durante a qual esta memória é acessada ou re-

experienciada pelo indivíduo, modificações na expressão de determinados comportamentos podem revelar a existência desta (Bear et al 2002).

Alguns estudos realizados na década de 60 demonstraram que tratamentos amnésicos são capazes de comprometer não somente memórias novas, mas também memórias previamente consolidadas, desde que estas memórias sejam reativadas antes do tratamento (Misanin et al 1968; Schneider & Sherman 1968). Assim, estes achados conduziram a proposta de que, independente da idade, uma memória pode estar susceptível a alterações, conquanto que a mesma esteja em um estado ativo. De fato, nas décadas seguintes, outros estudos confirmaram que uma memória já estabelecida pode se tornar temporariamente instável após a sua evocação (Bustos et al 2009a; Nader & Hardt 2009; Nader et al 2000b; Przybyslawski & Sara 1997).

Assim sendo, após a etapa de evocação, ou seja, após os animais serem re-expostos ao EC, na ausência do EI, a memória previamente formada pode seguir dois caminhos opostos: extinção ou reconsolidação (Pedreira & Maldonado 2003). Enquanto a extinção trata-se de um novo processo de aprendizado, o qual pode sobrepor-se a associação original, a reconsolidação está relacionada com um reforço da memória inicialmente formada (Tronson & Taylor 2007).

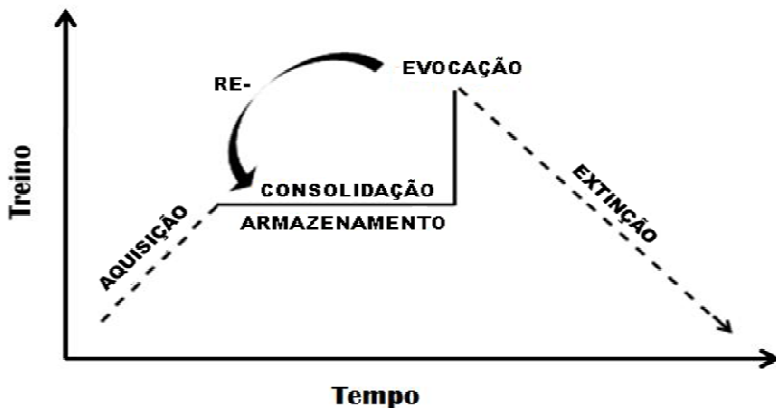
Um maior conhecimento acerca das bases neuroanatômicas, farmacológicas e comportamentais envolvidas nos processos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas, utilizando animais de laboratório e o condicionamento clássico aversivo como ferramentas experimentais, tem facilitado a compreensão dos mecanismos envolvidos no TEPT, bem como auxiliado no desenvolvimento de tratamentos mais efetivos para esta patologia (Chang et al 2009; Milad et al 2006).

#### ***1.4 Fronteiras entre os mecanismos de extinção e reconsolidação***

Uma série de fatores limítrofes entre os processos de extinção e reconsolidação têm sido descritos, entre eles: a idade da memória (há quanto tempo o treino ocorreu), a intensidade com que ela ocorreu (quantidade de treinos), as estruturas neuranatômicas envolvidas na formação desta memória e, em especial, o tempo de duração da sessão de evocação. Em conjunto estes fatores são determinantes importantes

para definir em que direção uma memória seguirá (Suzuki et al 2004; Tronson & Taylor 2007).

De maneira sucinta, a reconsolidação ocorre em geral após uma breve re-exposição ao EC e tem sido descrita como um componente do processamento da memória de longa duração. No entanto, este processo não se trata apenas de uma reiteração do processo de consolidação, mas sim de um evento ativo, dependente de síntese de proteína, que transcorre no sentido de re-estabelecer a memória evocada (Lee et al 2006; Nader et al 2000a). Quando a sessão de re-exposição ultrapassa um determinado período crítico, toma a cena o fenômeno da extinção, o qual ocasiona uma diminuição da resposta condicionada com conseqüente redução na ocorrência dos comportamentos defensivos numa subsequente sessão de evocação (Myers & Davis 2002). A figura 1 ilustra de maneira esquemática as diferentes etapas envolvidas no processo mnemônico.



**Figura 1.** Representação esquemática das diferentes etapas envolvidas durante o processamento da memória (adaptado de Izquierdo, 2002).

### ***1.5 Características comportamentais e teorias cognitivas da extinção***

A extinção é um processo complexo que tem resistido a uma simples e breve explanação desde que foi inicialmente caracterizado. No entanto, sabe-se que a inibição da resposta defensiva que ocorre durante a extinção não se trata de um processo de esquecimento ou habituação



ao estímulo condicionado. Uma prova disto tem sido demonstrada através de um fenômeno denominado *Renovação*, onde uma resposta condicionada extinta pode ressurgir quando o sujeito é testado fora do contexto no qual o treino de extinção foi realizado (Bouton & Bolles 1979). Além disto, memórias extintas podem sofrer uma “*Recuperação Espontânea*” com o passar do tempo (Rescorla 2004; Westbrook et al 2002); ou um “*Reestabelecimento*” após uma simples re-apresentação do estímulo incondicionado (Westbrook et al 2002).

Uma das teorias propostas para se compreender o fenômeno de extinção é a sugestão de que este processo trata-se de um novo aprendizado, o qual estaria agindo contra a expressão da resposta de medo condicionada (Bouton 2000; Delamater 2004). De maneira semelhante ao que ocorre no aprendizado, etapas distintas no processo de extinção têm sido descritas, dentre elas uma fase de aquisição, consolidação e evocação (Quirk & Mueller 2008). Esta teoria reforça a idéia de que memórias de medo não são “apagadas” durante a extinção, mas sim inibidas de maneira contexto-dependente, de forma que os sujeitos aprendem de maneira associativa que, agora, neste ambiente, as pistas (estímulos) não mais indicam um evento aversivo (Davis et al 2006).

Em contrapartida, diversos autores têm proposto que mecanismos não-associativos possam estar modulando os processos de extinção (Kamprath & Wotjak 2004; McSweeney & Swindell 2002). Desta forma, modulações nos níveis de representação do estímulo condicionado podem conferir uma redução da resposta condicionada. Isto implica dizer que um organismo aprende a ignorar um estímulo condicionado pelo simples fato de que este não mais prediz de maneira confiável o aparecimento de um estímulo incondicionado (Mackintosh, 1974).

Nos últimos anos, no entanto, uma visão mais ampla acerca dos mecanismos envolvidos no processo de extinção tem sido descrita. Evidências demonstram que mecanismos múltiplos, incluindo aprendizados associativos, não-associativos e até mesmo, em estudos mais recentes, mecanismos de plasticidade neuronal, parecem estar envolvidos no fenômeno da extinção; apesar da exata natureza destes mecanismos e a maneira com que eles interagem ainda não estar completamente elucidada (Myers et al 2006).

## ***1.6 Características comportamentais e teorias cognitivas da reconsolidação***

Uma memória torna-se duradoura através de um processo denominado consolidação, o qual transforma informações recentes em aprendidas. Durante a fase inicial de consolidação, as memórias são lábeis e podem ser interrompidas por interferências como traumas, crises convulsivas, outros aprendizados ou a administração de drogas, incluindo os inibidores de síntese de proteínas (Dudai 2004; McGaugh 2000).

As teorias tradicionais de consolidação da memória postulavam que após um período de estabilização do processo de consolidação, as memórias tornavam-se gradualmente estáveis, resistentes e insensíveis a interferências. No entanto, esta visão clássica de consolidação foi desafiada alguns anos mais tarde por uma série de evidências indicando que, após a fase de evocação, memórias previamente estabilizadas podem retornar a um estado lábil, passando a sofrer influências dos mesmos agentes e eventos que interferiam no processo de consolidação (Alberini et al 2006).

Estudos pioneiros de Misanin e colaboradores (Misanin et al 1968) em animais de laboratório demonstraram que a aplicação de um choque eletroconvulsivo, imediatamente após a evocação de uma memória previamente consolidada, era capaz de “apagar” ou “abolir” a memória reativada. Os autores descartaram a possibilidade de tal prejuízo estar ocorrendo em função de uma interferência geral com o processo de consolidação, uma vez que este mesmo choque aplicado no mesmo período de tempo após o aprendizado, mas em ausência de uma sessão de reativação, foi incapaz de causar efeitos sobre a posterior evocação da memória original.

Esta idéia de que uma memória previamente consolidada poderia sofrer interferências após a fase de evocação foi contestada nesta mesma época por Dawson e McGaugh (Dawson & McGaugh 1969), uma vez que os mesmos não foram capazes de replicar os experimentos originais. Em adição, outros pesquisadores sugeriam ainda que a amnésia provocada após a sessão de reativação tratava-se de um evento apenas transitório (Mactutus et al 1979). Ainda hoje, alguns autores acreditam que o fenômeno de reconsolidação trata-se de um processo transitório, atribuindo os efeitos comportamentais observados nos testes experimentais a um prejuízo temporário nos processos de evocação da memória, ao invés de um eventual déficit de armazenamento (Eisenberg & Dudai 2004; Lattal & Abel 2004; Prado-Alcala et al 2006).

Apesar destas contradições, uma série de estudos em roedores utilizando diferentes testes de memória e agentes amnésicos, incluindo

hipotermia e inibidores de síntese de proteínas, confirmou os achados iniciais de Misanin e colaboradores (Judge & Quartermain 1982; Mactutus et al 1982; Schneider & Sherman 1968). De acordo com esta hipótese, Lewis (1979) propôs que as memórias existem em um estado ativo ou inativo. Enquanto memórias novas são mantidas em um estado ativo durante a fase de aprendizado original, memórias armazenadas permanecem em um estado inativo, sem sofrerem manipulações, até que as mesmas sejam evocadas. Após serem reativadas, estas memórias passam a um estado ativo e tornam-se sensíveis a interferências, podendo portanto ser moduladas em diferentes direções.

Recentemente, outros estudos utilizando o condicionamento aversivo têm confirmado esta mesma proposição ao demonstrarem que a manipulação farmacológica ou a inativação de áreas específicas do cérebro, imediatamente após a fase de evocação, são capazes de ocasionar um prejuízo da memória originalmente formada (Bustos et al 2009b; Duvarci et al 2008; Nader & Hardt 2009; Nader et al 2000a). Vale ressaltar que este bloqueio no processo de reconsolidação é exclusivo e específico para a memória de medo reativada, mantendo outras memórias intactas (Doyere et al 2007); e que a mesma não retorna espontaneamente com a passagem do tempo, com a mudança do ambiente testado ou após a exposição a eventos estressantes (Duvarci & Nader 2004).

Uma questão que permanece a ser desvendada é a razão pela qual uma memória reativada torna-se lábil e requer síntese de proteína para ser reconsolidada (Sara 2000). Dentre várias sugestões, uma hipótese proposta é a de que este estado vulnerável do processo de reconsolidação permite que novas informações possam ser associadas e estabelecidas com a memória originalmente formada (Alberini 2005; Hupbach et al 2007). Tendo como base esta premissa, o implemento da manipulação farmacológica em pacientes com TEPT, após a reativação de uma memória traumática, poderia modificar o caráter aversivo desta memória, prevenindo desta forma posteriores recorrências do trauma (Diegaarde et al 2008).

### ***1.7 Sistemas neurais envolvidos no TEPT***

Evidências clínicas têm implicado três regiões cerebrais como estruturas chave para o desenvolvimento do TEPT: o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal medial (CPF). O hipocampo parece estar envolvido com o processamento da memória explícita do episódio traumático, ou seja, com os mecanismos cognitivos que envolvem o

evento aversivo e sua estrutura contextual (Nadel 1987). Além disto, esta região parece exercer um papel modulatório sobre a amígdala, inibindo a atividade desta estrutura e por consequência suprimindo a resposta de medo frente a situações de estresse moderado (McGaugh 2004).

Estudos utilizando técnicas de imagem, como a ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons, têm revelado uma redução do volume hipocampal em pacientes com TEPT, quando comparados a pacientes saudáveis (Bremner et al 1995; Kitayama et al 2005). Estes achados sugerem que o TEPT pode estar associado a danos hipocampais, os quais estariam ocasionando um déficit no processamento das memórias explícitas. No entanto, é importante salientar que a redução do volume hipocampal visualizada em pacientes com TEPT, pode não ser a causa desta patologia, mas ao invés disto, um fator predisponente. Com este enfoque, é possível que as alterações hipocampais visualizadas em pacientes com TEPT já estejam presentes antes da ocorrência deste transtorno, facilitando de alguma forma o desenvolvimento desta condição (Gilbertson et al 2002).

Uma série de relatos clínicos e experimentais tem sustentado a afirmação de que as porções mediais do córtex pré-frontal medial (CPFm) exercem um controle inibitório sobre a amígdala; e que falhas neste sistema de inibição estariam criticamente relacionadas com a patogenia do TEPT (Delgado et al 2008; Milad et al 2006; Shin et al 2006). A amígdala emite projeções para estruturas hipotalâmicas e do tronco encefálico que executam os componentes fisiológicos, autonômicos e musculoesqueléticos da resposta emocional, desempenhando desta forma um papel crucial em experiências negativas como o medo e a ansiedade (LeDoux 1998). Assim sendo, em indivíduos saudáveis, um controle inibitório do CPFm sobre a amígdala estaria amortecendo o funcionamento desta estrutura; enquanto que, em pacientes com TEPT, uma disfunção neste controle impediria esta inibição, possibilitando assim uma atividade desenfreada desta região (Koenigs & Grafman 2009).

### ***1.8 Bases neuroanatômicas dos mecanismos de extinção***

Diversas estruturas cerebrais têm sido implicadas nos mecanismos de extinção de memórias aversivas, incluindo em geral o córtex sensorial (Teich et al 1989), a substância cinzenta periaquedutal (McNally et al 2004), o septo lateral (Yadin et al 1993), o estriado dorsal e ventral (Rogan et al 2005) e o núcleo do leito da estria terminal (Waddell et al 2006). No entanto, um destaque especial tem sido dado ao hipocampo,

a amígdala e ao CPFm, tendo em vista que, além destas estruturas desempenharem um papel crucial nos processos de extinção do medo em animais de laboratório, as mesmas são também as regiões neuroanatômicas envolvidas na circuitaria neural do TEPT (Myers & Davis 2007).

O hipocampo tem sido descrito como estrutura chave no desenvolvimento de representações cognitivas do contexto durante o condicionamento de medo (Fanselow 2000; Rudy & O'Reilly 1999). De fato, este papel do hipocampo no processamento contextual e na evocação da memória de medo, tem sido demonstrado em uma série de estudos experimentais envolvendo protocolos de extinção do medo condicionado ao contexto (Barad 2005; Bouton et al 2006).

Alguns estudos têm descrito que, apesar de não ser crítico para o aprendizado da extinção, o hipocampo está diretamente envolvido na associação deste aprendizado com o contexto em que o mesmo ocorreu (Corcoran et al 2005). Esta hipótese tem sido sustentada por outros estudos nos quais ratos submetidos a inativação reversível ou lesão eletrolítica do hipocampo, não apresentaram interferências significativas no processo de aquisição da extinção; porém exibiram um comprometimento no fenômeno de renovação (Corcoran & Maren 2004; Ji & Maren 2005). Conforme descrito previamente para este fenômeno, uma resposta condicionada que sofreu extinção em um contexto “X” pode ressurgir quando testada em um contexto “Y”, por exemplo. Assim sendo, um déficit no fenômeno de renovação, ou seja, um prejuízo na evocação da resposta condicionada quando os animais lesados foram testados em um ambiente distinto daquele em que o treino da extinção ocorreu; sugere uma participação substancial do hipocampo no processamento contextual durante a evocação da extinção (Corcoran & Maren 2004).

Apesar de uma série de estudos descreverem um papel do hipocampo na mediação do processamento contextual e na evocação da extinção, é pouco provável que o armazenamento da memória de extinção ocorra nesta estrutura (Bouton et al 2006). De fato, evidências recentes têm demonstrado que, de maneira semelhante ao que ocorre no condicionamento de medo (Davis et al 1994), os mecanismos de aquisição e consolidação da extinção parecem estar diretamente conectados com a amígdala (Lu et al 2001; Walker et al 2002). Enquanto a microinfusão de inibidores de síntese protéica ou de antagonistas glutamatérgicos do tipo NMDA na porção basolateral da amígdala bloqueiam, respectivamente,

a evocação ou a aquisição do processo de extinção; a administração de agonistas NMDA facilita estes processos (Akirav & Maroun 2007).

Observações recentes têm demonstrado que, em um protocolo de condicionamento clássico de medo, um aumento na atividade da porção ventral do CPFm reduz a responsividade de neurônios da amígdala central - os quais disparam regularmente após a apresentação do estímulo condicionado - apenas quando este mesmo estímulo condicionado é re-apresentado durante a sessão de evocação da extinção (Milad & Quirk 2002). Isto implicaria dizer que, sob situações normais de supressão do medo, o CPFvm estaria reduzindo a atuação de neurônios específicos da amígdala e por consequência promovendo a extinção do medo. Em contrapartida, frente a situações de estresse severo, a atividade inibitória do CPFvm sobre estes neurônios da amígdala estaria drasticamente reduzida, resultando em uma resistência ao fenômeno de extinção com conseqüente resposta exagerada e inapropriada de medo (Akirav & Maroun 2007; Morgan et al 1993), conforme visto em pacientes com TEPT (Shin et al 2001).

Conforme mencionado, o CPFm desempenha um papel chave na regulação de memórias aversivas. Esta região parece fornecer uma interface entre estruturas límbicas e corticais, através do controle da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal frente a situações de estresse (Sullivan & Gratton 2002). Assim sendo, o CPFm tem sido descrito como estrutura crítica na integração entre estados afetivos e respostas autonômicas/neuroendócrinas (Groenewegen & Uylings 2000). Estudos experimentais têm revelado que a lesão do CPFvm, bem como a microinfusão de inibidores de síntese protéica nesta região, impede a evocação da memória de extinção do medo condicionado durante a sessão de teste (Quirk et al 2000; Santini et al 2004). Em adição, outros achados têm reportado que a exposição breve ou repetida ao estresse prejudica a evocação da extinção do medo condicionado; e que, este prejuízo, parece estar correlacionado com uma retração dos espinhos dendríticos dos terminais apicais de neurônios do CPFvm (Izquierdo et al 2006; Miracle et al 2006).

### ***1.9 Bases neuroanatômicas dos mecanismos de reconsolidação***

Nas últimas décadas, estudos de lesão ou inativação funcional de regiões específicas do cérebro têm possibilitado uma maior compreensão acerca das estruturas neuroanatômicas envolvidas nos mecanismos de consolidação de memórias. Estes trabalhos têm demonstrado que a consolidação de diferentes tipos de memória

(espaciais, contextuais, aversivas e apetitivas) requer a ativação de distintas áreas cerebrais, sugerindo a existência de diferentes sistemas de memória (Poldrack & Packard 2003).

Nos últimos anos, uma investigação direta tem sido realizada no sentido de determinar se a consolidação e a reconsolidação são mecanismos similares ou distintos; e se as mesmas regiões cerebrais estão implicadas nestes processos (Alberini 2005). Para tal, alguns laboratórios têm investigado os efeitos da administração de inibidores de síntese de proteína em áreas específicas do cérebro. O resultado destes estudos apresenta conclusões contrastantes.

Em um destes estudos, Taubenfeld e colaboradores (Taubenfeld et al 2001) demonstraram no modelo de esquiva inibitória em ratos que a síntese de proteínas no hipocampo dorsal parece ser crucial para o processo de consolidação, mas não para a etapa de reconsolidação. Em outro estudo, Bahar e colaboradores (Bahar et al 2004) demonstraram que circuitos específicos da amígdala são seletivamente requisitados durante a consolidação, mas não durante a reconsolidação de uma memória gustativa aversiva. Ainda, Hernandez e colaboradores (Hernandez et al 2002) demonstraram que a síntese de proteínas no núcleo accumbens é necessária para a consolidação, mas não para a reconsolidação de uma memória apetitiva instrumental. Em concordância com estes achados, outros estudos utilizando técnicas imunoistoquímicas ou a injeção intracerebral de bloqueadores de fatores de transcrição têm evidenciado a participação de estruturas cerebrais distintas entre os processos de consolidação e reconsolidação (Lee et al 2004; Maroun & Akirav 2009; Tronel & Sara 2002).

Em contraste com estes estudos, outros pesquisadores têm sugerido que os mecanismos de consolidação e reconsolidação envolvem processos similares. Nader e colaboradores (Nader et al 2000a) reportaram em ratos que, a síntese de proteínas na amígdala e no hipocampo é necessária tanto para a consolidação como para a reconsolidação do medo condicionado. Akirav & Maroun (Akirav & Maroun 2006) demonstraram que, tanto a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA como a ocorrência de síntese proteica no CPFvm, são fundamentais para as etapas de consolidação e reconsolidação da memória no modelo de reconhecimento de objeto em ratos. Em adição, uma série de estudos examinando o requerimento de moléculas específicas e fatores de transcrição intranuclear nos processos de consolidação e reconsolidação têm reforçado a idéia de que ambos os processos compartilham as mesmas estruturas neurais (Artinian et al 2008; Kelly et al 2003; Kida et al 2002; Languille et al 2009).

Levando-se em consideração estes achados contrastantes, mais estudos são necessários para identificar com clareza as estruturas cerebrais envolvidas durante o período que sucede a reativação de uma determinada memória.

### ***1.10 Tratamentos farmacológicos para o TEPT***

Apesar da relevância epidemiológica e da sintomatologia debilitante do TEPT, apenas duas medicações aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration -USA*) para o tratamento desta patologia estão atualmente disponíveis no mercado: a sertralina e a paroxetina. Estes fármacos, antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, têm sido atualmente prescritos para amenizar uma parcela específica de sintomas presentes neste transtorno, incluindo: perda de interesse, sentimentos de indiferença, tristeza, raiva, aborrecimento e dificuldade de concentração (Marshall et al 2001; Stein et al 2003). No entanto, não bastasse o número restrito de opções farmacológicas para a terapia deste transtorno, ambas as medicações disponíveis têm ocasionado uma série de efeitos colaterais em seus usuários. Estes efeitos, que variam em intensidade e duração de um indivíduo para outro, incluem dores de cabeça, náuseas, sonolência, cansaço, agitação e problemas sexuais; e em geral podem induzir o paciente a descontinuar o tratamento (Masand 2003).

Além das medicações oficialmente indicadas para o tratamento do TEPT, outras opções clínicas como os benzodiazepínicos, os antipsicóticos e outras classes de antidepressivos têm sido prescritas para esta enfermidade, apesar de não existirem relatos concretos acerca da eficácia destas medicações no alívio dos sintomas presentes (Davidson 2006).

Uma série de estudos pré-clínicos têm sugerido que a administração de D-cicloserina - um agonista parcial de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA - associada à terapia de exposição pode auxiliar no tratamento de determinados transtornos de ansiedade, incluindo o TEPT (Davis et al 2006; Hofmann 2007; Ressler et al 2004). Este efeito em potencial da D-cicloserina tem sido atribuído a um aumento na função do receptor NMDA, facilitando a neuroplasticidade e os processos de extinção; ou a uma redução na atividade deste receptor, ocasionando desta forma um prejuízo na reconsolidação das memórias traumáticas (Norberg et al 2008).

### ***1.11 Características farmacológicas dos receptores adrenérgicos***



Os receptores adrenérgicos são uma classe de receptores acoplados a proteína G que são alvos de ação da noradrenalina e da adrenalina. Técnicas de biologia molecular indicam a existência de pelo menos cinco importantes tipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) classificados em diversos subtipos farmacologicamente ativos. Estes receptores podem ser subdivididos em diversas categorias distintas, tendo como base suas especificidades farmacológicas e ações fisiológicas (Flordellis et al 2004).

A estimulação dos subtipos de receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  por ligantes agonistas ocasiona a ativação de uma enzima ligada à membrana, adenilciclase, que catalisa a conversão de ATP (adenosina tri-fosfato) em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). A ativação da enzima adenilciclase é mediada por uma proteína G estimulatória. Uma vez formado, o AMPc ativa proteínas-quinasas dependentes de AMPc, as quais ocasionam fosforilações sucessivas possibilitando a amplificação dos sinais e a geração da resposta farmacológica (Wallukat 2002).

De forma oposta, a ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos leva à inibição da adenilciclase, através de uma proteína G inibitória distinta, levando a uma diminuição na produção de AMPc e conseqüente redução da transdução intracelular (Spinosa et al 2006). Já os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, atuam através de um sistema diferenciado de segundos mensageiros. A etapa inicial deste processo consiste na ativação de uma enzima de membrana denominada fosfolipase C. Esta fosfolipase hidrolisa especificamente um componente fosfolipídico da membrana plasmática, di-fosfato de inositol, que após sofrer clivagem dá origem aos segundos mensageiros diacilglicerol e tri-fosfato de inositol. Em uma etapa posterior, estes mensageiros promovem a ativação de proteína-quinasas e a liberação de cálcio das vesículas intracelulares, ocasionado desta forma uma série de efeitos farmacológicos (Garcia-Sainz et al 1999).

### ***1.12 O sistema noradrenérgico em foco no tratamento do TEPT***

Evidências da participação do sistema noradrenérgico na modulação de memórias emocionais em humanos têm sido demonstradas em estudos experimentais onde, o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos com propranolol, reduz seletivamente memórias para eventos emocionais sem interferir com memórias para situações neutras ou triviais (Cahill et al 1994; van Stegeren 2008). Tópico de interesse entre

pesquisadores e clínicos, a utilização de bloqueadores beta-adrenérgicos, como o propranolol, tem sido discutida como possível intervenção terapêutica para o tratamento do TEPT nos últimos anos (van Stegeren 2008). De fato, estudos clínicos têm ressaltado uma eficácia destes fármacos na remissão dos sintomas do TEPT, embora o exato mecanismo sobre os processos cognitivos não esteja completamente descrito (Evers 2007; Kindt et al 2009; Rodrigues et al 2009; Rosenberg 2007).

Em geral, a utilização de bloqueadores beta-adrenérgicos como alternativa terapêutica para o TEPT tem sido inspirada na teoria da reconsolidação, na qual as memórias, uma vez evocadas, tornam-se lábeis por um determinado período após a evocação (Brunet et al 2008). Desta forma, associadas a técnicas de psicoterapia, estas drogas poderiam exercer seus efeitos durante o exato momento em que as memórias apresentam-se instáveis, interferindo desta forma na versão final da memória reconsolidada (Giles 2005).

Afora os presumíveis efeitos benéficos do propranolol sobre o processamento cognitivo de memórias aversivas, esta droga tem sido especialmente prescrita para reduzir os sintomas somáticos (ex. pressão sanguínea alta, angina peitoral, ritmo cardíaco irregular) e psicológicos (ex. ansiedade social) presentes no curso do TEPT (Tollenaar et al 2009b). Em consentimento ao papel chave do sistema noradrenérgico na modulação de memórias traumáticas, estudos recentes têm destacado ainda uma participação dos receptores alfa-1-adrenérgicos na manifestação da sintomatologia do TEPT. Prazosin, um antagonista seletivo de receptores alfa-1-adrenérgicos (Antonello et al 2005), tem sido amplamente utilizado para tratar pacientes com hipertensão (Takahashi 2007). Achados clínicos demonstraram que a administração de prazosin, em doses similares àquelas utilizadas para o controle da pressão sanguínea, foi casualmente benéfica no sentido de aliviar os sintomas do TEPT em pacientes que apresentavam uma comorbidade deste transtorno com hipertensão (Raskind et al 2000); possivelmente devido as habilidades deste composto em cruzar a barreira hematoencefálica (Rogawski & Aghajanian 1982).

Confirmando estes achados, uma série de estudos clínicos e experimentais tem demonstrado a remissão da sintomatologia do TEPT, incluindo: redução nos distúrbios de sono e pesadelos, diminuição na recorrência das memórias traumáticas e melhora nos quadros de irritabilidade, vigilância excessiva e perda de interesse. No entanto, de maneira semelhante ao que ocorre com o uso dos beta-bloqueadores para o TEPT, permanecem a ser esclarecidos os processos cognitivos

responsáveis pelo alívio dos sintomas presentes (Dierks et al 2007; Raskind et al 2003; Taylor & Raskind 2002; Taylor et al 2008).

### ***1.13 A neurotransmissão noradrenérgica na formação de memórias aversivas***

Em organismos de mamíferos, a exposição a eventos traumáticos ou situações de perigo ocasiona a ativação simpático-adrenal, através da liberação de adrenalina e noradrenalina da medula da adrenal, responsável por uma série de alterações fisiológicas - denominadas “reações de alarme”- fundamentais para o indivíduo lidar com a eventual ameaça (Heim & Nemeroff 2009). Diversos estudos têm demonstrado que esta ativação noradrenérgica, frente a situações de estresse severo, está diretamente implicada na formação de memórias aversivas que perduram por um longo período após a retirada do evento estressor (Adamec et al 2007; McGaugh 2000; Orr et al 2006; Southwick et al 1999).

De fato, estudos experimentais em animais de laboratório têm descrito que a administração de agonistas adrenérgicos facilita a aquisição de memórias de medo (Gold & Van Buskirk 1975; Introini-Collison & McGaugh 1986), enquanto a injeção de antagonistas, em especial os bloqueadores beta-adrenérgicos (ex. propranolol), impede a aquisição (Do Monte et al 2008; Gold et al 1986; Stern et al 2008), a consolidação (Cahill et al 2000; Ferry & McGaugh 1999; Kroon & Carobrez 2009) ou a evocação (Murchison et al 2004; Ouyang & Thomas 2005; Rodriguez-Romaguera et al 2009) deste processo. Embora menos estudados, os receptores alfa-1-adrenérgicos também parecem desempenhar um papel importante na modulação de memórias aversivas (Manion et al 2007).

Este papel crítico dos receptores noradrenérgicos nas mais distintas etapas do processamento de memórias aversivas, tem levantado como questão um possível envolvimento da transmissão noradrenérgica nos mecanismos de extinção e reconsolidação destas memórias. Embora alguns estudos tenham evidenciado um papel para os receptores beta-adrenérgicos nos processos de extinção de memórias aversivas (Mueller et al 2008; Ouyang & Thomas 2005), outros estudos falharam em demonstrar tal participação (Cain et al 2004; Rodriguez-Romaguera et al 2009).

Em adição a estes resultados conflitantes, o potencial envolvimento dos receptores alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas permanece por ser

investigado. Por estas razões, o presente estudo avaliou os efeitos da manipulação sistêmica dos receptores alfa-1- e beta-adrenérgicos em ratos expostos a dois modelos comportamentais: o modelo de extinção do medo condicionado contextual e o modelo de reconsolidação do medo condicionado olfatório. Um estudo cardiovascular prévio, utilizando ratos anestesiados, permitiu a seleção de doses apropriadas para os antagonistas noradrenérgicos utilizados nos testes comportamentais, além de fornecer informações acerca dos valores basais e dos possíveis efeitos residuais destes fármacos sobre a frequência cardíaca e a pressão arterial. Uma avaliação imunoistoquímica para quantificação da expressão de proteína Fos - um marcador de atividade neural - (Morgan & Curran 1991) foi realizada no CPFvm de ratos após a primeira e a última sessão de extinção do medo condicionado contextual.

Sabe-se que o CPFm recebe projeções densas de fibras noradrenérgicas do locus coeruleus, o principal núcleo noradrenérgico do sistema nervoso central (Aston-Jones et al 1985; Robbins 1984). Em adição, o CPFm apresenta uma imunorreatividade significativa para dopamina beta-hidroxilase - a enzima responsável pela síntese de noradrenalina - (Oropeza et al 2007); bem como uma alta concentração de receptores alfa-1- (Day et al 1997; Pieribone et al 1994) e beta-adrenérgicos (Rainbow et al, 1984). Assim sendo, uma etapa posterior deste estudo avaliou os efeitos da microinjeção intra-CPFm de compostos noradrenérgicos nos mecanismos de extinção e reconsolidação do medo condicionado.

Levando-se em consideração os fatos relatados na introdução, o presente estudo testou a hipótese de que drogas que facilitam os processos mnemônicos poderiam favorecer os mecanismos de extinção, enquanto que fármacos amnésicos prejudicariam estes processos. Em adição, o estudo investigou se de fato uma memória aversiva previamente consolidada poderia se tornar lábil e susceptível à interferência farmacológica após uma sessão curta de evocação. Tendo em vista o papel do sistema noradrenérgico na formação de memórias aversivas, o presente estudo testou a hipótese de que os receptores noradrenérgicos poderiam estar envolvidos ainda na modulação dos processos cognitivos que sucedem a fase de evocação; sugerindo o CPFm como substrato neural para os possíveis efeitos. Para confirmar tais hipóteses os objetivos seguintes foram delineados.

## 2. OBJETIVOS

Com base na hipótese anterior, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação dos receptores beta- e alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de extinção e reconsolidação de memórias aversivas, bem como investigar a participação do CPFm como substrato neural envolvido na modulação dos possíveis efeitos. Para este propósito, as seguintes etapas foram seguidas:

- Avaliar os efeitos da administração única ou repetida de compostos noradrenérgicos sobre os parâmetros cardiovasculares em ratos anestesiados, permitindo desta forma a seleção de um regime de injeção e de doses apropriadas para os estudos comportamentais posteriores;
- Verificar os efeitos da administração única ou repetida de compostos beta-adrenérgicos nos mecanismos de aquisição e consolidação da extinção do medo condicionado contextual;
- Verificar os efeitos do bloqueio dos receptores alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de aquisição e consolidação da extinção do medo condicionado contextual;
- Investigar o potencial envolvimento do CPFm nas etapas iniciais e finais do processo de extinção do medo condicionado contextual, utilizando técnicas imunoistoquímicas para detecção de proteína Fos, um marcador de atividade neural;
- Observar os efeitos da microinjeção direta de compostos beta- ou alfa-1-adrenérgicos sobre os mecanismos de aquisição e consolidação da extinção do medo condicionado contextual;
- Avaliar o envolvimento dos receptores beta- e alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de reconsolidação do medo condicionado olfatório;
- Verificar o envolvimento das porções dorsal e ventral do CPFm nos mecanismos de reconsolidação do medo condicionado olfatório através do bloqueio direto dos receptores alfa-1-adrenérgicos nestas regiões.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Ratos Long-Evans hooded machos com 12-16 semanas de idade e pesando entre 300-350 gramas foram utilizados nos experimentos. Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, foram mantidos em caixas plásticas (50 cm x 30 cm x 15 cm) forradas com cerca de 10 cm de maravalha de madeira esterilizada em número de 3-4 animais por caixa. Os mesmos foram alojados em uma sala com temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ) sob um ciclo claro-escuro (luz controlada após as 7:00 h a.m.) e com água e comida *ad libitum*.

#### 3.2 Drogas

Hidrocloreto de propranolol (antagonista beta-adrenérgico, Sigma-Aldrich, USA; 5, 10 ou 20 mg/Kg) ou isoproterenol (agonista beta-adrenérgico, Sigma-Aldrich, USA; 1, 2,5 ou 5 mg/Kg) foram dissolvidos (10 mg/ml ou 2,5 mg/ml; respectivamente) em salina (0,9% NaCl) - a qual sozinha serviu como controle. Hidrocloreto de prazosin (antagonista alfa-1-adrenérgico, Sigma-Aldrich, USA; 0,5 ou 1,5 mg/Kg) foi dissolvido em água destilada em uma concentração de 0,5 mg/ml. As drogas foram administradas via intraperitoneal (IP) em um volume de injeção de 1 ml/Kg. As doses utilizadas foram selecionadas tendo como base estudos prévios realizados em nosso laboratório, bem como uma avaliação cardiovascular realizada no presente estudo. O agonista beta-adrenérgico isoproterenol (0,025; 0,075 e 0,25  $\mu\text{g/Kg}$ ) e o agonista alfa-1-adrenérgico fenilefrina (Sigma-Aldrich, USA; 0,6, 2 e 6  $\mu\text{g/Kg}$ ) foram utilizados via endovenosa (EV) para a avaliação cardiovascular.

Xilazina 2% (2,5 mg/Kg, Rompun, Bayer®, Brasil) e Quetamina 10% (15 mg/Kg, Dopalen, Agribands®, Brasil) foram administradas via IP como anestésicos para a realização das técnicas de cirurgia estereotáxica e avaliação cardiovascular. Hidrato de Cloral 15% (Sigma-Aldrich, USA, 200 mg/Kg) foi utilizado como anestésico antes dos procedimentos de imunohistoquímica e perfusão. Heparina (30 UI) diluída em salina tamponada (PBS, em mM: 137 NaCl, 2,7 KCl, 1,5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 8,1  $\text{NaHPO}_4$ , pH 7,4) foi utilizada como anticoagulante.

Atenolol [(RS) – Atenolol, Tocris, USA; 10 ou 40 nmol], isoproterenol (Sigma-Aldrich, USA; 10 ou 40 nmol) ou prazosin (0,75, 1,5 ou 2,5 nmol) foram dissolvidos em PBS, o qual sozinho serviu como controle, e injetados bilateralmente via intracerebral em um volume de 0,2 µl por hemisfério.

### **3.3 Monitoramento cardíaco**

Os animais foram inicialmente anestesiados com xilazina (2,5 mg/Kg) e ketamina (15 mg/Kg) via IP. Em seguida, um cateter de polietileno heparinizado (PE 20) foi inserido na veia femoral esquerda, permitindo assim uma via de acesso para a injeção de drogas. Para evitar a formação de coágulos, uma dose de heparina (30 UI) foi administrada após a canulação venosa. A artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo deste vaso foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo proximal foi temporariamente suprimido através da compressão do mesmo com o auxílio de um pinça curva. Um cateter transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA), introduzido na porção medial da artéria carótida, foi utilizado para o monitoramento cardíaco. Os valores referentes à frequência cardíaca, medidos em número de batimentos por minuto (b.p.m.), e pressão arterial média, medidos em milímetros de mercúrio (mmHg), foram registrados a cada 0,5 segundos através de um computador acoplado ao sistema (software Powerlab 8/30; AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Um período pós-cirúrgico de 30 minutos foi adotado para a estabilização dos parâmetros cardíacos e início dos testes experimentais.

### **3.4 Modelos Experimentais**

#### *3.4.1 Caixa de condicionamento*

O condicionamento de medo contextual ou olfatório ocorreu em uma caixa (35 cm x 20 cm x 30 cm) construída de alumínio, com a parede frontal e o teto feitos de acrílico. O piso gradeado, feito com barras de metal inoxidável (3 mm de diâmetro e afastadas 0,9 mm centro a centro), foi conectado a uma placa de circuitos (Insight, Ch 2001, Ribeirão Preto, SP, Brasil), a qual permitiu que os choques fossem programados em intensidade e tempo e disparados de acordo com o protocolo experimental (Fig. 2A).

Todas as sessões de extinção do condicionamento contextual perduraram por 10 minutos, durante os quais a porcentagem do tempo de congelamento (caracterizado pela ausência completa de movimentos, exceto aqueles necessários para respiração) foi registrada e utilizada como parâmetro de retenção de memória. O índice de extinção foi representado pela porcentagem do tempo de congelamento durante a primeira sessão de extinção, menos a porcentagem do tempo de congelamento na última sessão, dividido pelo tempo total de congelamento na primeira sessão de extinção.

No modelo de condicionamento olfatório de medo, um compartimento em forma de gaveta, localizado abaixo do piso gradeado da caixa, serviu para a localização do estímulo olfatório durante as sessões de pareamento e reativação. Um pedaço de papel filtro (5 cm x 5 cm) embebido em 50 µl de amilacetato (5%; Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como fonte de odor. A caixa foi limpa com papel toalha, embebido em uma solução de etanol a 10%, antes da introdução de cada animal. O condicionamento contextual ou olfatório de medo ocorreu em uma sala com iluminação controlada de 100 lux.

#### *3.4.2 Caixa de odor*

Para reduzir interferências contextuais, a fase de teste do condicionamento olfatório de medo foi realizada em uma caixa distinta, denominada caixa de odor, sob uma iluminação controlada de 4 lux. Este aparato, feito de acrílico preto e em formato retangular, foi dividido em dois compartimentos: um aberto (40 cm x 26 cm x 36 cm) e um fechado (20 cm x 26 cm x 36 cm). Um orifício quadrado (6 cm x 6 cm), localizado na parede frontal da porção fechada da caixa, permitiu a livre circulação dos animais entre ambos os lados do modelo (Fig. 2B). Um pedaço de papel filtro, sem odor ou impregnado com o odor previamente condicionado, foi fixado na parede oposta do compartimento aberto, de acordo com a sessão experimental.

A caixa foi limpa com papel toalha, embebido em uma solução de etanol a 10%, antes da introdução de cada animal. Os parâmetros comportamentais avaliados ao longo dos 10 minutos de exposição ao modelo foram:



- *Porcentagem do Tempo de Aproximação* - % de tempo que os ratos permaneceram a uma distância menor que 7 cm da fonte de odor;

- *Porcentagem do Tempo Escondido* - % de tempo que os ratos permaneceram no compartimento fechado da caixa;

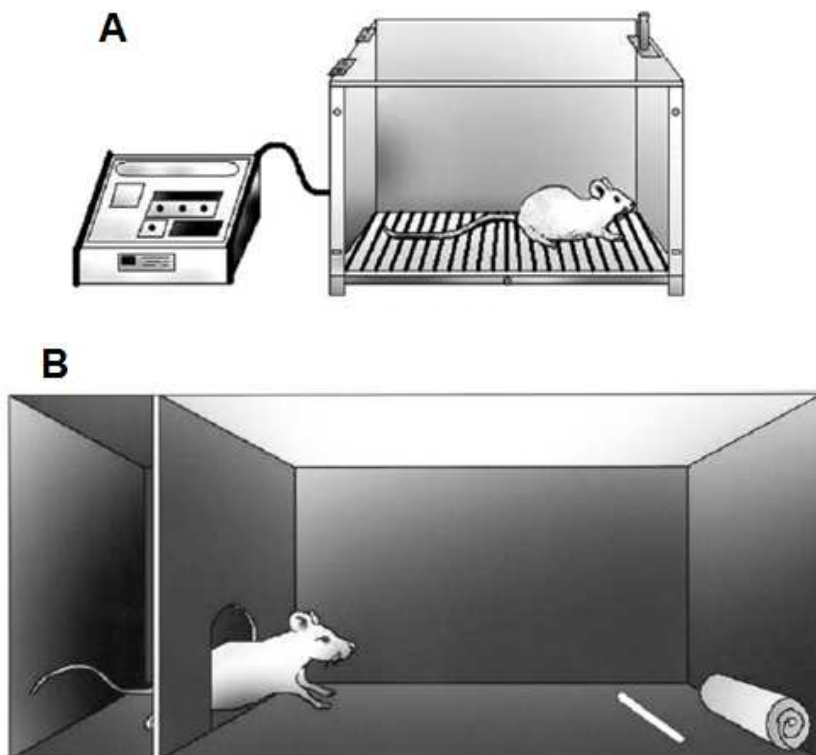
- *Número de Aproximações* – frequência em que os animais aproximaram-se a uma distância menor que 7 cm da fonte de odor;

- *Tempo de Head-out* – tempo em que os ratos permaneceram no compartimento fechado da caixa, mas com a cabeça, ou a cabeça e os membros anteriores, direcionada para o compartimento aberto.

### **3.5 Cirurgia estereotáxica**

Os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina via IP e posteriormente fixados no aparelho estereotáxico (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Após a tricotomia, as regiões interaural e frontal da cabeça foram esterilizadas com um algodão embebido em iodopovidine. Uma incisão sagital foi realizada para a exposição da calota craniana e remoção do periósteo. Com o auxílio de uma broca odontológica, a calota craniana foi perfurada para o implante de duas cânulas guias (11 mm) direcionadas à porção medial do córtex pré-frontal (CPFm): [anteroposterior (AP): 11,8 mm rostral à linha interaural previamente registrada; medio-lateral (ML): 0,6 mm à partir da linha sagital mediana e dorsoventral (DV): 1,8 mm ventral à superfície craniana], conforme as coordenadas do atlas de rato de Paxinos & Watson (1998).

A superfície craniana foi recoberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante. Dois parafusos previamente fixados sobre o crânio serviram de sustentação, permitindo a formação de uma prótese sólida após o endurecimento do acrílico. Em cada uma das cânulas implantadas foi adaptado um mandril (nº 30) para evitar um posterior entupimento. Ao término da cirurgia, os animais foram mantidos em uma sala com aquecedor até a recuperação completa da anestesia. Um período pós-operatório de sete dias foi estabelecido para o início dos experimentos.



**Figura 2.** Representação esquemática mostrando A) a caixa de condicionamento e B) a caixa de odor. Os modelos foram utilizados nos experimentos de extinção do medo condicionado contextual (A) e reconsolidação do medo condicionado olfatório (A e B). Fonte: (Kroon & Carobrez 2009).

### 3.6 Microinjeção intracerebral

As microinjeções foram realizadas com o auxílio de agulhas injetoras (12 mm ou 14 mm, respectivamente para as porções dorsal e ventral do CPFm) introduzidas bilateralmente através das cânulas-guias após a remoção dos mandris de proteção. As agulhas foram acopladas a duas micro-seringas (Hamilton 5  $\mu$ l) através de tubos de polietileno (PE 10). Uma bomba de infusão (Insight®, modelo B12000) permitiu a administração correta de 0,2  $\mu$ l por hemisfério cerebral em uma velocidade constante de 0,6  $\mu$ l/s. As agulhas foram mantidas no interior

das cânulas por um período adicional de 20 segundos para maximizar a difusão e evitar um possível refluxo da droga.

### 3.7 Procedimentos

Todos os procedimentos e testes experimentais realizados durante este trabalho foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.006118/2004-36/UFSC) e estão de acordo com o guia de cuidados para o uso de animais de laboratório do *National Institute of Health* (1985).

Uma câmera de vídeo, posicionada a 80 cm da parede frontal de cada modelo, foi adaptada a um aparelho de DVD e permitiu o registro das imagens para posterior avaliação. Os experimentos foram realizados em uma sala com som atenuado durante a fase clara do ciclo claro-escuro de acordo com o protocolo experimental a seguir:

*Experimento 1: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica aguda ou repetida de compostos adrenérgicos.*

O presente estudo avaliou os valores basais de frequência cardíaca e pressão arterial antes ou 30 minutos após a administração (IP) de propranolol (N=4; 10 mg/Kg) ou prazosin (N=4; 0,5 mg/Kg). As doses utilizadas durante a avaliação cardiovascular foram semelhantes às aquelas selecionadas para os experimentos de aquisição da extinção. Em seguida, um monitoramento do aumento da frequência cardíaca induzido pela injeção de isoproterenol (0,025 0,075 e 0,25 µg/Kg) ou do aumento da pressão arterial média provocado pela injeção de fenilefrina (0,6, 2 e 6 µg/Kg EV), foram realizados para confirmar que o intervalo de tempo e as doses utilizadas para ambos os compostos foram regimes adequados de injeção. As doses de isoproterenol e fenilefrina utilizadas para as curvas dose-resposta foram selecionadas com base em um estudo piloto prévio.

Os efeitos da administração sistêmica e repetida (IP; três dias consecutivos) de propranolol (N=5; 20 mg/Kg), isoproterenol (N=5; 5 mg/Kg) ou prazosin (N=5; 1,5 mg/Kg) foram avaliados durante o quarto dia, na ausência de drogas. Os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca foram inicialmente registrados. Em seguida, alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial média entre estes grupos foram registradas, respectivamente após a administração

crescente de isoproterenol ou fenilefrina, para investigar a presença residual de drogas neste dia.

*Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica aguda de propranolol, isoproterenol ou salina na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.*

Os animais foram mantidos em uma sala adjacente por pelo menos trinta minutos antes do início dos experimentos. Em seguida, eles foram individualmente transferidos para a sala experimental e colocados na caixa de condicionamento para explorarem o modelo por um minuto. Após este período, os mesmos receberam um choque elétrico (1,0 mA, 2 s de duração) nas patas e foram mantidos na caixa por um minuto adicional. No dia seguinte, os animais foram randomicamente divididos e receberam uma injeção única de propranolol, isoproterenol ou salina, trinta minutos antes (aquisição da extinção) de retornarem para a caixa de condicionamento, em uma sessão denominada extinção 1. Nos três dias consecutivos (sessões de extinção 2, 3 e 4) os animais foram re-expostos a mesma caixa na ausência de drogas.

*Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica repetida de propranolol, isoproterenol ou salina nas fases de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.*

Os ratos foram condicionados ao contexto de maneira semelhante àquela descrita no experimento 2. No dia seguinte, os animais foram randomicamente divididos para receberem administrações de propranolol, isoproterenol ou salina trinta minutos antes (aquisição da extinção) ou imediatamente após (consolidação da extinção) as sessões de extinção 1, 2 e 3. No quarto dia, os animais retornaram para a caixa na ausência de drogas e a porcentagem do tempo de congelamento foi registrada.

*Experimento 4: Avaliação imunoistoquímica da expressão de proteína Fos no CPFvm nos grupos controle e tratados com salina, propranolol ou isoproterenol antes da sessão de extinção.*

Um grupo de ratos foi sistemicamente tratado com propranolol (N=6; 10 mg/Kg), isoproterenol (N=6; 2,5 mg/Kg) ou salina (N=6) trinta minutos antes da sessão de extinção 1. Um segundo grupo de animais recebeu administrações sistêmicas de propranolol (N=8; 10

mg/Kg), isoproterenol (N=6; 2,5 mg/Kg) ou salina (N=6) trinta minutos antes das sessões de extinção 1, 2 e 3 e foram expostos sem drogas a uma quarta sessão de extinção. Um grupo adicional, administrado com salina e mantido na caixa moradia sem ter sido submetido às sessões de extinção, foi utilizado como controle (N=6).

Noventa minutos após as sessões de extinção 1 e 4, respectivamente para o primeiro e segundo grupo, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos por via intracárdica com uma solução de paraformaldeído 4% diluída em PBS 0,1 M em pH 7,4. Após a decapitação, os encéfalos foram removidos da calota craniana e mantidos em sacarose 20%, diluída em PBS 0,1 M, a uma temperatura de 4 C° durante 24 horas. No dia seguinte, os encéfalos foram congelados e fatiados no plano frontal, em quatro séries de 40 µm de espessura nas proximidades do CPFm, com o auxílio de um criostato (Leica, CM 1850).

Uma série completa de secções foi processada com soro anti-Fos produzido em coelho (Ab-5, lot#4191-1-2; Calbiochem) na diluição de 1:20.000. O anti-soro primário foi localizado utilizando-se uma variação do sistema complexo avidina-biotina (ABC). As secções foram incubadas por 90 minutos em temperatura ambiente em uma solução biotinilada anti-IgG de coelho produzida em cabras (Laboratório Vector) e então colocadas em uma solução mista do complexo avidina-biotina peroxidase (Kit elite ABC, Laboratório Vector) pelo mesmo período de tempo.

O complexo peroxidase foi visualizado após 10 minutos de exposição a uma solução cromógena de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina a 0,02 % (DAB) com sulfato de níquel amônio 0,3 % (DAB-Ni) diluído em 0,05 M de tampão tris, pH 7,6, seguido pela incubação por 5 minutos em uma solução cromógena com glicose-oxidase (10%) e β-D-Glicose (10%) para produzir uma coloração preta-azulada. A reação foi paralisada pela lavagem em solução de potássio-PBS, pH 7,4. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, posteriormente desidratadas e cobertas com uma lamínula fixada com DPX.

A contagem do número de neurônios imunorreativos para proteína Fos no CPFm foi realizada com o auxílio de um microscópio (Olympus, BX-41, objetiva de 10X) equipado com uma câmera digital

(3.3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging<sup>TM</sup>) previamente acoplada a um programa de computador (software Qcapture Pro 5.1, Qimaging<sup>TM</sup>) para captura das imagens. Para ser considerada uma célula imunorreativa positiva para Fos o núcleo do neurônio devia apresentar uma coloração preta-azulada, com uma forma circular ou oval e medir entre 8 e 15 µm. As células positivas para Fos foram plotadas e contadas em cinco níveis rostro-caudais distintos (120 µm de intervalo) usando um programa especializado de computação (Image J 1.42g; National Institute of Health, EUA).

*Experimento 5: Efeitos da administração sistêmica repetida de prazosin ou veículo na fase de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.*

Os animais foram pareados na caixa de condicionamento conforme descrito no experimento 2. No dia seguinte, os mesmos foram randomicamente separados em grupos que receberam veículo ou diferentes doses de prazosin trinta minutos antes (aquisição da extinção) ou imediatamente após (consolidação da extinção) as sessões de extinção 1, 2 e 3. No quarto dia, os animais retornaram para a caixa na ausência de drogas e a porcentagem do tempo de congelamento foi registrada.

*Experimento 6: Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS, atenolol ou isoproterenol na fase de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.*

Os animais foram pareados na caixa de condicionamento conforme descrito no experimento 2. No dia seguinte, os mesmos foram randomicamente separados em grupos que receberam PBS, atenolol, isoproterenol ou atenolol mais isoproterenol (10 minutos intervalo) dez minutos antes (aquisição da extinção) ou imediatamente após (consolidação da extinção) a primeira sessão de extinção. Após 24 horas, os animais retornaram para a caixa na ausência de drogas e a porcentagem do tempo de congelamento foi registrada.

*Experimento 7: Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS ou prazosin na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.*

Os animais foram pareados na caixa de condicionamento conforme descrito no experimento 2. No dia seguinte, os mesmos foram

randomicamente separados em grupos que receberam PBS ou prazosin em diferentes doses dez minutos antes (aquisição da extinção) da primeira sessão de extinção. Após 24h, os animais retornaram para a caixa na ausência de drogas e a porcentagem do tempo de congelamento foi registrada.

*Experimento 8: Efeitos da administração sistêmica aguda de propranolol, prazosin ou salina durante a fase de reconsolidação do medo condicionado olfatório.*

Os animais foram mantidos em uma sala adjacente por pelo menos trinta minutos antes do início dos experimentos. Em seguida, eles foram individualmente transferidos para a sala de experimentos e colocados na caixa de condicionamento para explorarem o modelo durante 4 minutos (DIA 1; sessão de familiarização 1). No dia seguinte (DIA 2; sessão de condicionamento), os animais retornaram para a mesma caixa na presença do estímulo olfatório. Ao longo dos 4 minutos da sessão de condicionamento, os animais receberam cinco choques elétricos (0,4 mA, 2 s de duração, intercalados 40 s) nas patas em associação com a presença da fonte de odor. Os mesmos foram mantidos na caixa por mais 40 s após a última associação. No dia seguinte (DIA 3; sessão de reativação), os animais retornaram para a mesma caixa por dois minutos, na presença do odor condicionado. A porcentagem do tempo de congelamento foi registrada durante as sessões de condicionamento e reativação.

Imediatamente após a sessão de reativação, os animais foram divididos em diferentes grupos e injetados com propranolol (10 ou 20 mg/kg IP), prazosin (0,5 ou 1,5 mg/kg IP) ou salina. Dois grupos de animais, não submetidos à sessão de reativação, foram mantidos em suas caixas moradia e receberam uma injeção de salina ou prazosin na maior dose. Após uma semana, os animais foram expostos a caixa de odor durante dez minutos (DIA 4; sessão de familiarização 2) na presença de um estímulo olfatório neutro. Esta sessão foi realizada para o registro dos valores basais comportamentais de cada grupo, bem como para observar a possível ocorrência do fenômeno de generalização. No dia seguinte (DIA 5; sessão de teste) os animais retornaram para a caixa de odor, porém o estímulo olfatório neutro foi substituído pelo estímulo olfatório condicionado. A resposta comportamental defensiva de cada um dos grupos experimentais ao longo dos dez minutos de teste foi registrada e posteriormente avaliada.

***Experimento 9:** Efeitos da microinjeção de PBS ou prazosin nas porções dorsal e ventral do CPFm durante a fase de reconsolidação do medo condicionado olfatório.*

Os animais foram inicialmente pareados com um estímulo olfatório conforme descrito no experimento 8. No dia seguinte, imediatamente após a sessão de reativação, os mesmos foram randomicamente separados em grupos que receberam microinjeções de PBS ou prazosin nas porções dorsal ou ventral do CPFm. Uma semana após a sessão de reativação, os animais foram submetidos à caixa de odor em um protocolo similar àquele descrito no experimento 8.

### **3.8 Perfusão e histologia**

Após os testes experimentais, os animais previamente submetidos à cirurgia estereotáxica foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 15% (200 mg/Kg IP) e microinjetados com corante Azul de Evans (0,2 µl/lado; 3%) de maneira semelhante àquela utilizada no momento de injeção da droga. Em seguida, os animais foram perfundidos via intracardíaca com uma solução salina (0,9% NaCl), seguida por formaldeído (10%), durante 5 minutos cada. Após a decapitação com uma guilhotina, os encéfalos foram removidos da calota craniana com o auxílio de um alicate cirúrgico. Os mesmos foram acondicionados em frascos repletos de formaldeído (10%) por 24 horas, posteriormente transferidos para uma solução de sacarose (30%) e mantidos na geladeira por pelo menos 12 horas antes de serem histologicamente fatiados. Os cortes histológicos foram realizados com o auxílio de um criostato (LEICA CM 1850). As secções de 40 µm de espessura foram dispostas em lâminas de vidro e o sítio de microinjeção foi localizado com o auxílio de um estereoscópio, de acordo com o atlas de rato de Paxinos & Watson (Paxinos & Watson 1998).

### **3.9 Análise Estatística**

O teste “t” de Student para amostras dependentes foi utilizado para comparar as mudanças na frequência cardíaca e pressão arterial antes e após a administração de doses crescentes de isoproterenol ou fenilefrina, respectivamente. O teste “t” de Student para amostras independentes foi utilizado para detectar diferenças na frequência cardíaca e pressão arterial entre os grupos tratados com propranolol e salina ou prazosin e salina, trinta minutos após (injeção aguda) ou um



dia após o tratamento realizado previamente por três dias consecutivos (injeção repetida).

A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste Duncan foi utilizada para detectar as diferenças no parâmetro índice de extinção entre os grupos distintos, bem como para comparar os parâmetros: porcentagem de tempo escondido e de aproximação, número de aproximações e tempo de head-out; durante a fase de teste do modelo de reconsolidação do medo condicionado olfatório.

A análise de variância de duas vias seguida de teste Duncan foi utilizada para comparar o número de células no CPFvm imunorreativas para Fos entre o grupo controle e os grupos tratados com propranolol, isoproterenol ou salina no primeiro e no quarto dia de extinção.

A análise de variância para medidas repetidas seguida de teste Duncan foi utilizada para detectar diferenças na porcentagem do tempo de congelamento durante as sessões de extinção entre os grupos tratados sistemicamente ou microinjetados no CPFvm. Os dados foram representados por média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). O nível de significância estatística adotado em todos os experimentos foi de  $p < 0.05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (version 8.0, Statsoft®, Tulsa, USA).

## 4. RESULTADOS

### *Experimento 1: Avaliação dos parâmetros cardiovasculares após a administração sistêmica aguda ou repetida de compostos adrenérgicos.*

O pré-tratamento com propranolol (10 mg/Kg, IP), 30 minutos antes, foi capaz de bloquear ( $p < 0,05$ ) o aumento da frequência cardíaca produzido pela administração de doses crescentes do agonista beta-adrenérgico isoproterenol (0,025; 0,075 e 0,25  $\mu\text{g/Kg}$  EV) sem alterar os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca (Fig. 3A). Por outro lado, o tratamento repetido com propranolol (20 mg/Kg) por três dias consecutivos não foi capaz de bloquear a taquicardia induzida por diferentes doses de isoproterenol durante o quarto dia, quando os animais foram avaliados sem o efeito de drogas (Fig. 3B). Ainda, a administração repetida de propranolol (20 mg/Kg IP) ou salina durante três dias consecutivos não modificou de maneira significativa os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca avaliados no quarto dia na ausência de drogas (Fig. 3B).

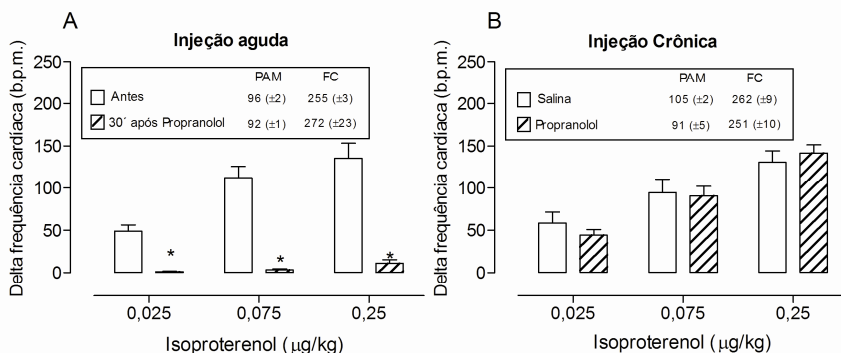


Figura 3. A) Avaliação do efeito antagonista da injeção sistêmica aguda (30 minutos antes) ou B) repetida (três dias consecutivos) de propranolol (10mg/Kg ou 20 mg/Kg IP, respectivamente) sobre o aumento da frequência cardíaca induzido por doses crescentes de isoproterenol (0,025; 0,075 e 0,25  $\mu\text{g/Kg}$  EV) em ratos anestesiados. Os valores basais de pressão arterial média (PAM; em mmHg= milímetros de mercúrio) e frequência cardíaca (FC; b.p.m.= batimentos por minuto) encontram-se expressos em forma de números inseridos no interior das legendas. Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 5 por grupo). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao mesmo grupo antes da injeção.

Conforme ilustrado na figura 4A, a administração de prazosin (0,5 mg/Kg IP), 30 minutos antes, foi capaz de prevenir ( $p < 0,05$ ) o aumento da pressão arterial induzida pela injeção de doses crescentes de fenilefrina (0,6; 2 e 6  $\mu\text{g/Kg}$ ), sem alterar os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca. A administração repetida de prazosin (1,5 mg/Kg IP) por três dias consecutivos não modificou os parâmetros cardiovasculares basais nem impediu a vasoconstricção induzida pela injeção de fenilefrina no quarto dia (Fig. 4B).

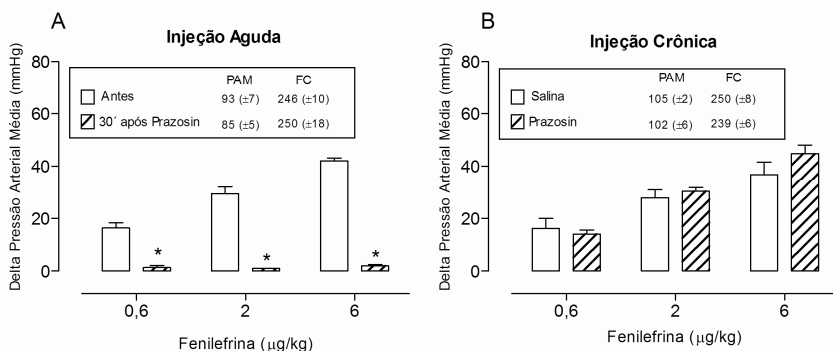


Figura 4. A) Avaliação do efeito antagonista da injeção sistêmica aguda (30 minutos antes) ou B) repetida (três dias consecutivos) de prazosin (0,5 mg/Kg ou 1,5 mg/Kg IP, respectivamente) sobre o aumento da pressão arterial média induzido por doses crescentes de fenilefrina (0,6; 2 e 6  $\mu\text{g/Kg}$  EV) em ratos anestesiados. Os valores basais de pressão arterial média (PAM; em mmHg= milímetros de mercúrio) e frequência cardíaca (FC; b.p.m.= batimentos por minuto) encontram-se expressos em forma de números inseridos no interior das legendas. Dados expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 5 por grupo). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao mesmo grupo antes da injeção.

*Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica aguda de propranolol, isoproterenol ou salina na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.*

A primeira etapa dos experimentos comportamentais foi conduzida para investigar os possíveis efeitos da injeção aguda do agonista beta-adrenérgico isoproterenol ou do antagonista beta-adrenérgico propranolol na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.

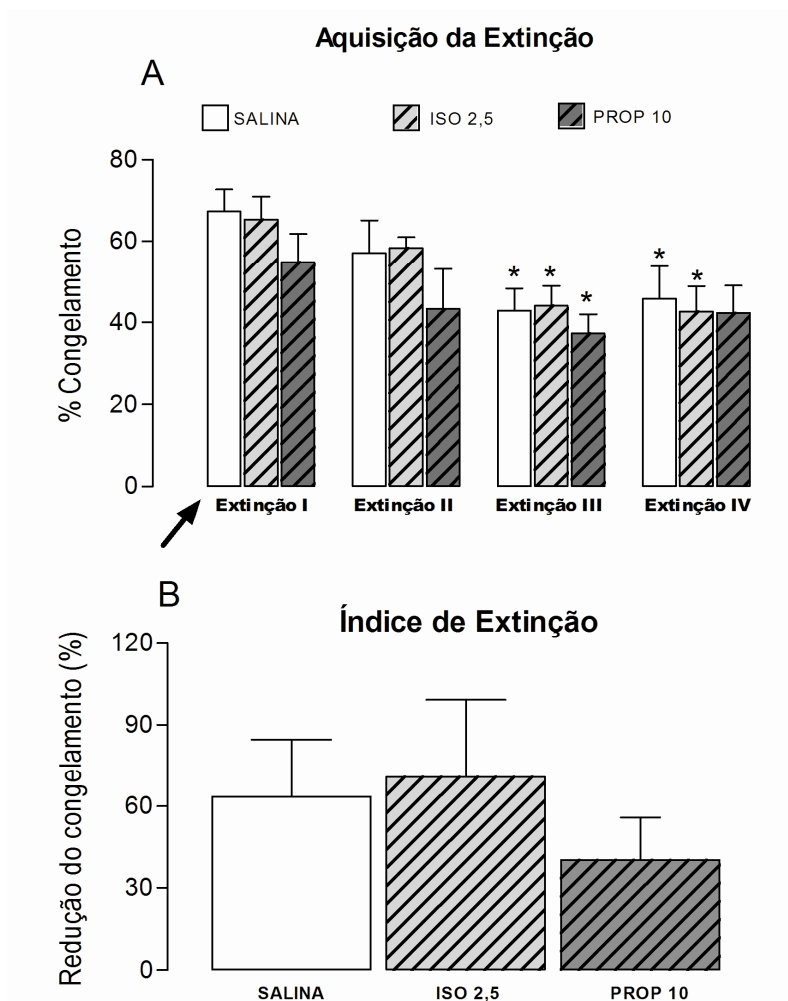
A análise de variância para medidas repetidas revelou um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) apenas para o fator sessão de extinção [ $F_{(3,54)} = 18.51$ ;  $p < 0,0001$ ]. Diferenças estatísticas não foram observadas para o fator tratamento ou para a interação entre os fatores sessão de extinção versus tratamento. A análise subsequente utilizando teste Duncan revelou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem do tempo de congelamento da primeira para a última sessão de extinção, tanto no grupo salina como nos grupos tratados com isoproterenol ou propranolol, sugerindo a ocorrência de extinção ao longo dos dias de exposição (Fig. 5A).

A análise de variância de uma via não detectou diferenças no parâmetro índice de extinção entre os grupos distintos (Fig. 5B).

*Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica repetida de propranolol, isoproterenol ou salina nas fases de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.*

O teste de análise de variância com medidas repetidas demonstrou diferenças estatísticas para o fator tratamento [ $F_{(4,41)} = 3.83$ ,  $p < 0,01$ ], para o fator sessão de extinção [ $F_{(3,123)} = 16.61$ ,  $p < 0,0001$ ] e para a interação entre estes fatores [ $F_{(12,123)} = 2.25$ ,  $p < 0,05$ ] em relação ao parâmetro porcentagem do tempo de congelamento nos grupos tratados com injeções repetidas de propranolol, isoproterenol ou salina na fase de aquisição da extinção do medo contextual (Fig. 6A).

Conforme ilustrado na figura 6A, a análise subsequente utilizando o teste Duncan demonstrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem do tempo de congelamento da primeira pra a terceira ou quarta sessões de extinção no grupo tratado com salina. Esta redução no comportamento de congelamento sugere a ocorrência de extinção do medo contextual no grupo controle ao longo das sessões. Ratos administrados com ambas as doses de isoproterenol (1 e 2,5 mg/Kg) ou propranolol na dose de 5 mg/Kg demonstraram uma redução significante ( $p < 0,05$ ) no tempo de congelamento durante a quarta sessão de extinção, quando comparados ao mesmo grupo durante a primeira sessão.

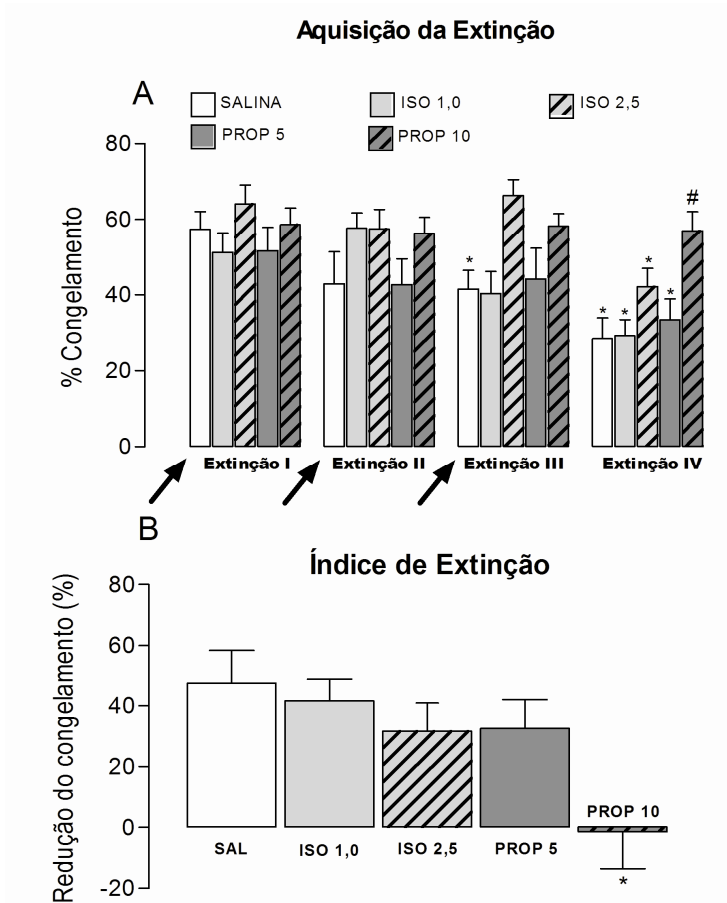


**Figura 5.** A) Efeitos da administração aguda de salina, isoproterenol (ISO; 2,5 mg/kg IP) ou propranolol (PROP; 10 mg/kg IP), 30 minutos antes da sessão de extinção 1 (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos (dez minutos cada sessão) Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo durante a sessão de extinção 1. ↑ = momento da injeção; B) índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9 por grupo).

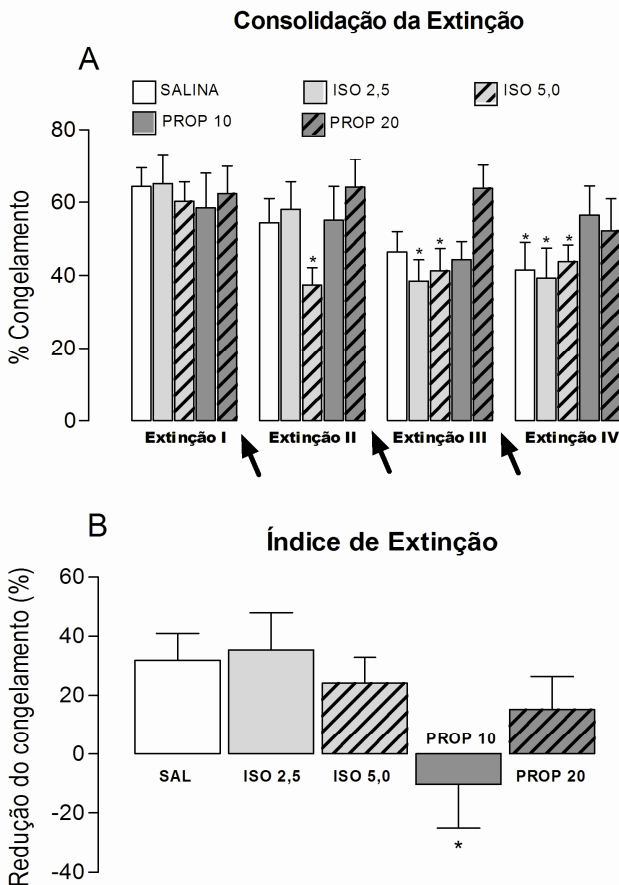
Em contraste, a porcentagem do tempo de congelamento no grupo tratado com propranolol na dose de 10 mg/Kg não alterou de maneira significativa ao longo das sessões de extinção. Em adição, a porcentagem do tempo de congelamento durante a quarta sessão de extinção neste grupo foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) do grupo salina, sugerindo que a dose de 10 mg/Kg de propranolol foi capaz de prejudicar a aquisição da extinção do medo condicionado contextual (Fig. 6A). De fato, a análise de variância de uma via, seguida pelo teste Duncan, revelou uma diminuição significativa [ $F_{(4,41)} = 3.64$ ;  $p < 0,05$ ] no parâmetro índice de extinção para os animais tratados com propranolol (10 mg/Kg), quando comparados ao grupo que recebeu salina (Fig. 6B).

Os efeitos da administração repetida de propranolol, isoproterenol ou salina na fase de consolidação da extinção do medo contextual foram avaliados através da injeção destas drogas imediatamente após as sessões de extinção 1, 2 e 3. A análise de variância com medidas repetidas não revelou diferenças na porcentagem do tempo de congelamento para o fator tratamento. No entanto, uma diferença significativa foi demonstrada para o fator sessão de extinção [ $F_{(3,12)} = 12.49$ ,  $p < 0,0001$ ] e para a interação entre os fatores tratamento versus sessão de extinção [ $F_{(12,129)} = 2.30$ ,  $p < 0,05$ ] para este mesmo parâmetro. A análise posterior utilizando o teste Duncan revelou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem do tempo de congelamento da primeira para quarta sessão de extinção nos sujeitos tratados com salina (Fig 7A). Este achado confirmou que quatro sessões de extinção foram suficientes para o grupo controle desenvolver a extinção do medo condicionado contextual. Esta redução no comportamento de congelamento foi previamente observada na segunda e na terceira sessões de extinção respectivamente para os grupos tratados com isoproterenol 5 e 2,5 mg/Kg (Fig. 7A).

De maneira oposta, os resultados ilustrados na figura 7A demonstram que os animais tratados com ambas as doses de propranolol (10 ou 20 mg/Kg) não apresentaram diferenças na porcentagem do tempo de congelamento ao longo das sessões de extinção, sugerindo que o bloqueio beta-adrenérgico imediatamente após cada sessão de extinção foi capaz de prejudicar os mecanismos de consolidação da extinção do medo condicionado contextual.



**Figura 6.** A) Efeitos da administração repetida de salina, isoproterenol (ISO; 1,0 e 2,5 mg/kg IP) ou propranolol (PROP; 5 e 10 mg/kg IP), 30 minutos antes das sessões de extinção 1, 2 e 3 (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \*p < 0,05 comparado ao respectivo grupo durante a sessão de extinção 1; # p < 0,05 comparado ao grupo salina durante a mesma sessão de extinção. ↑= momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Legenda: \*p < 0,05 comparado ao grupo salina. Os valores obtidos foram expressos em média ± e.p.m. (N= 9-10 por grupo).



**Figura 7.** A) Efeitos da administração repetida de salina, isoproterenol (ISO; 2,5 e 5 mg/kg IP) ou propranolol (PROP; 10 e 20 mg/kg IP), imediatamente após as sessões de extinção 1, 2 e 3 (consolidação da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo durante a sessão de extinção 1; ↑= momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 8-12 por grupo).

De fato, a análise de variância de uma via, seguida pelo teste Duncan, revelou uma diminuição significativa [ $F_{(4,43)} = 2.51$ ;  $p < 0.05$ ]



no parâmetro índice de extinção para o grupo tratado com a dose de 10 mg/Kg, quando comparado ao grupo salina (Fig. 7B).

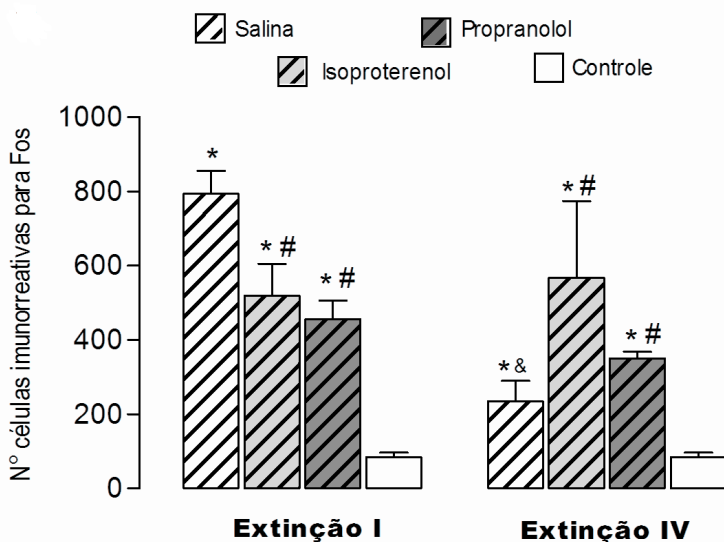
*Experimento 4: Avaliação imunoistoquímica da expressão de proteína Fos no CPFvm nos grupos controle e tratados com salina, propranolol ou isoproterenol antes da sessão de extinção.*

A análise de variância de duas vias detectou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no número de células positivas para Fos no CPFvm nos diferentes grupos para os fatores tratamento [ $F_{(3,42)} = 52.49$ ,  $p < 0,0001$ ], sessão de extinção [ $F_{(1,42)} = 7.00$ ,  $p < 0,05$ ] e para a interação entre estes fatores [ $F_{(3,42)} = 11.03$ ,  $p < 0,0001$ ].

Conforme visualizado na figura 8, a análise posterior utilizando teste Duncan demonstrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de células positivas para Fos nos grupos salina, isoproterenol ou propranolol após a primeira e a quarta sessão de extinção, quando comparados ao grupo controle que permaneceu na caixa moradia. Ambos os grupos tratados com isoproterenol ou propranolol demonstraram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de células do CPFvm imunorreativas para Fos após a primeira sessão de extinção, quando comparados ao grupo salina. A análise posterior revelou também um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) destas células, em comparação ao grupo salina, quando os animais foram tratados com isoproterenol ou propranolol trinta minutos antes das sessões de extinção 1, 2 e 3 e avaliados sem droga após a quarta sessão de extinção. Em adição, apenas o grupo salina demonstrou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de células do CPFvm imunorreativas para Fos entre a primeira e a quarta sessão de extinção.

*Experimento 5: Efeitos da administração sistêmica repetida de prazosin ou veículo na fase de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.*

A análise de variância revelou um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para o fator tratamento [ $F_{(2,2)} = 3.88$ ,  $p < 0,05$ ] e sessão de extinção [ $F_{(3,66)} = 52.0$ ,  $p < 0,00001$ ] em relação ao parâmetro porcentagem do tempo de congelamento nos grupos administrados com prazosin (0,1 ou 0,5 mg/Kg) ou veículo durante três dias consecutivos antes da fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.



**Figura 8.** Efeitos da injeção sistêmica de compostos beta-adrenérgicos na expressão de proteína Fos no CPFvm durante a extinção do medo condicionado contextual nos grupos controle e tratados com salina, propranolol (10 mg/Kg) ou isoproterenol (2,5 mg/Kg), 30 minutos antes das sessões de extinção 1, 2, e 3, durante a primeira e a quarta sessão de extinção. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle na mesma sessão de extinção; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina na mesma sessão de extinção; &  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo durante a sessão de extinção 1. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 6-8 por grupo).

A análise posterior utilizando o teste Duncan demonstrou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no parâmetro tempo de congelamento da primeira para a segunda sessão de extinção no grupo tratado com veículo, a qual não foi visualizada nos grupos tratados com prazosin (Fig. 9A). Em adição, um aumento significativo na porcentagem do tempo de congelamento foi observado durante a terceira sessão de extinção para o grupo que recebeu prazosin 0,5 mg/Kg, comparado ao grupo veículo nesta mesma sessão (Fig. 9A). De fato, a análise de variância de uma via seguida de teste Duncan, revelou uma redução significativa [ $F_{(2,22)} = 3.0$ ;  $p < 0,05$ ] no parâmetro índice de extinção para este grupo, quando comparado ao grupo que recebeu veículo (Fig. 9B).

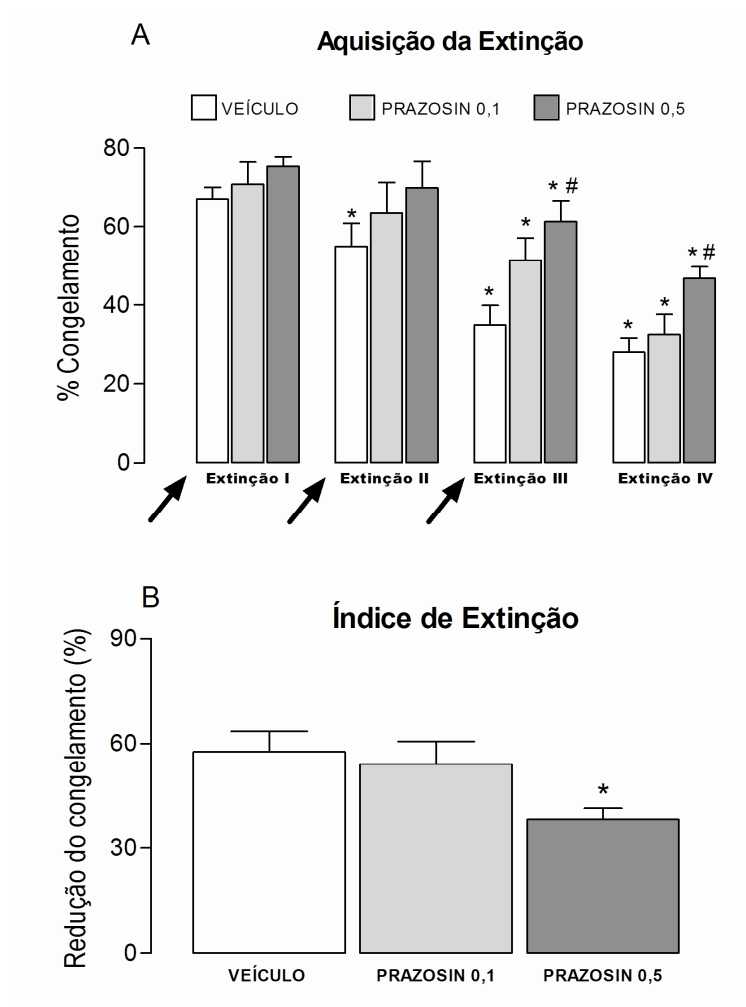
A análise de variância realizada nos dados obtidos dos grupos tratados com injeções sistêmicas de prazosin (0,5 ou 1,5 mg/Kg) ou veículo imediatamente após as sessões de extinção, demonstrou um efeito apenas para o fator sessão de extinção [ $F_{(3,90)} = 47.08$ ,  $p < 0,00001$ ]. A análise posterior utilizando o teste Duncan revelou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no comportamento de congelamento da primeira para a terceira ou quarta sessão de extinção para todos os grupos, independente do tratamento realizado (Fig. 10A). Não foram detectadas diferenças estatísticas [ $F_{(2,30)} = 0.39$ ;  $p = 0,67$ ] para o parâmetro índice de extinção entre os distintos grupos (ANOVA de uma via seguida de teste de Duncan; Fig. 10B).

*Experimento 6: Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS, atenolol ou isoproterenol na fase de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual.*

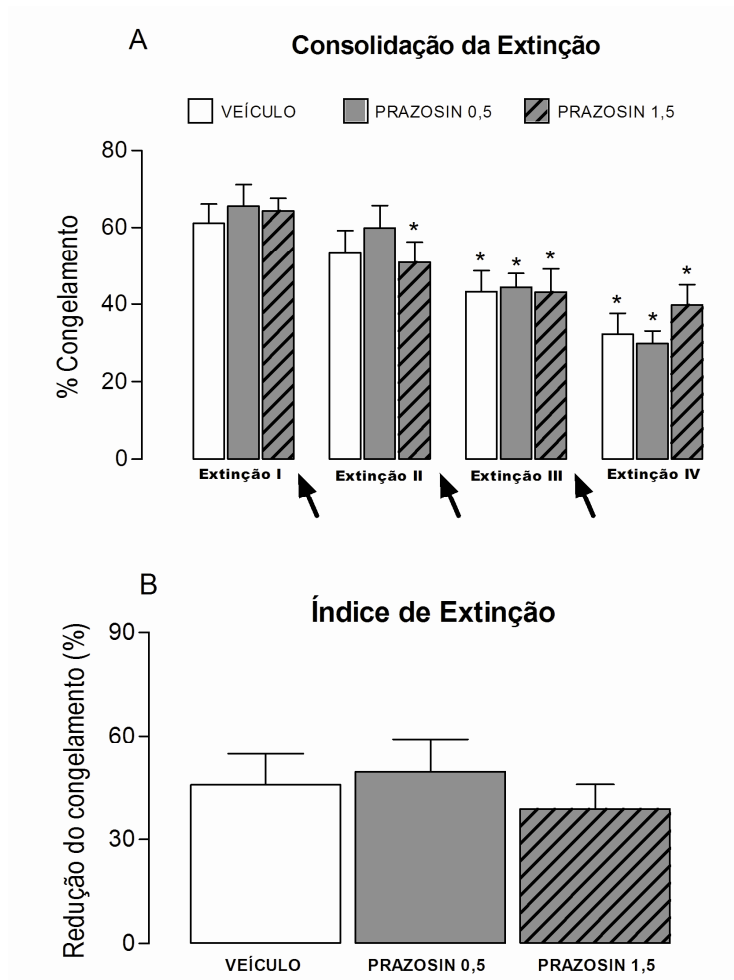
A análise de variância avaliando os efeitos da microinjeção de PBS, atenolol, isoproterenol ou atenolol mais isoproterenol, dez minutos antes da sessão de extinção 1, demonstrou um efeito significativo para os fatores tratamento [ $F_{(5,40)} = 4.1$ ,  $p < 0,005$ ], sessão de extinção [ $F_{(1,40)} = 8.25$ ,  $p < 0,01$ ] e para a interação entre estes [ $F_{(5,40)} = 2.76$ ,  $p < 0,05$ ].

O teste Duncan para análise posterior dos dados coletados na sessão de extinção 1 revelou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no tempo de congelamento no grupo microinjetado com isoproterenol 40 nmol, quando comparado ao grupo controle tratado com PBS (Fig. 11A). Esta redução no comportamento de congelamento não foi observada nos ratos microinjetados previamente com o antagonista beta-1-adrenérgico atenolol (40 nmol) dez minutos antes do tratamento com isoproterenol (40 nmol), sugerindo que os efeitos comportamentais visualizados nos animais tratados com isoproterenol 40 nmol foram mediados pelo receptor beta-1-adrenérgico.

De acordo com a figura 11A, uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem do tempo de congelamento da primeira para a segunda sessão de extinção foi detectada no grupo PBS. Esta redução demonstrou que duas sessões de extinção de dez minutos, separadas por um intervalo de 24 horas, foram suficientes para o grupo controle iniciar a extinção do medo condicionado contextual.



**Figura 9.** A) Efeitos da administração repetida de veículo ou prazosin (0,1 ou 0,5 mg/kg IP), 30 minutos antes das sessões de extinção 1, 2 e 3 (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo durante a sessão de extinção 1; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo veículo durante a mesma sessão de extinção. ↑ = momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9 por grupo).



**Figura 10.** A) Efeitos da administração repetida de veículo ou prazosin (0,5 ou 1,5 mg/kg IP), imediatamente após as sessões de extinção 1, 2 e 3 (consolidação da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante quatro dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo durante a sessão de extinção 1;  $\uparrow$  = momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 9-12 por grupo).

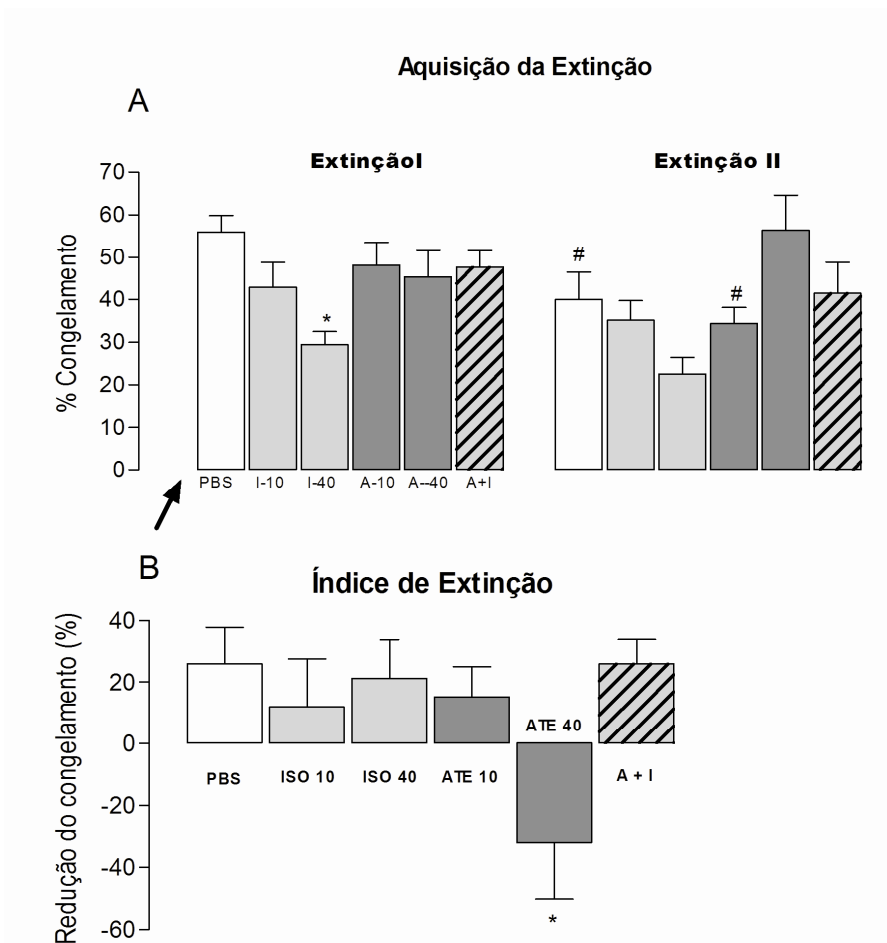
Esta diminuição no comportamento de congelamento visualizada no grupo controle, não foi observada, no entanto, quando os animais foram microinjetados com atenolol 40 nmol dez minutos antes da sessão de extinção 1, sugerindo uma participação dos receptores beta-1-adrenérgicos do CPFvm nos mecanismos de extinção do medo condicionado contextual.

De fato, a análise de variância de uma via seguida do teste Duncan, demonstrou uma redução significativa [ $F_{(5,40)} = 2.65$ ;  $p < 0,05$ ] no parâmetro índice de extinção no grupo microinjetado com atenolol 40 nmol, quando comparado ao grupo controle tratado com PBS (Fig. 11B).

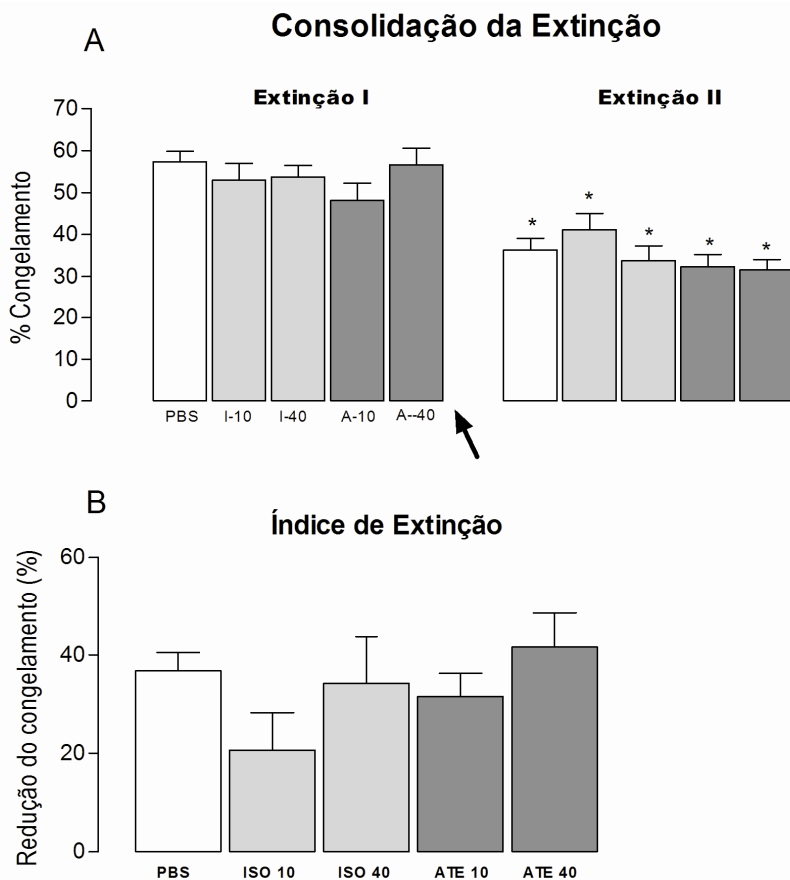
A análise de variância realizada para os dados obtidos dos grupos microinjetados imediatamente após a primeira sessão de extinção, demonstrou um efeito significativo somente para o fator sessão de extinção [ $F_{(1,36)} = 105.58$ ;  $p < 0,0001$ ]. O teste Duncan *a posteriori* revelou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem do tempo de congelamento da primeira para a segunda sessão de extinção em todos os grupos, independente do tratamento realizado (Fig. 12A). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os distintos grupos para o parâmetro índice de extinção (ANOVA de uma via seguida de teste Duncan; Fig. 12B).

#### Experimento 7: Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS ou prazosin na fase de aquisição da extinção do medo condicionado contextual.

A análise de variância comparando os efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS ou prazosin (0,75 e 2,5 nmol), dez minutos antes da sessão de extinção 1, demonstrou um efeito significativo para o fator sessão de extinção [ $F_{(1,28)} = 18.60$ ,  $p < 0,0001$ ] e para a interação entre os fatores tratamento versus sessão de extinção [ $F_{(2,28)} = 6.64$ ,  $p < 0,01$ ].



**Figura 11.** A) Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle), isoproterenol (I; 10 ou 40 nmol), atenolol (A; 10 ou 40 nmol) ou atenolol mais isoproterenol (A+I; 10 minutos intercalados), dez minutos antes da primeira sessão de extinção (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante dois dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS na mesma sessão de extinção; #  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo na sessão de extinção 1. ↑ = momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9- por grupo).



**Figura 12.** A) Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle), isoproterenol (I; 10 ou 40 nmol) ou atenolol (A; 10 ou 40 nmol), imediatamente após a primeira sessão de extinção (consolidação da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante dois dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo na sessão de extinção 1. ↑= momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9- por grupo).

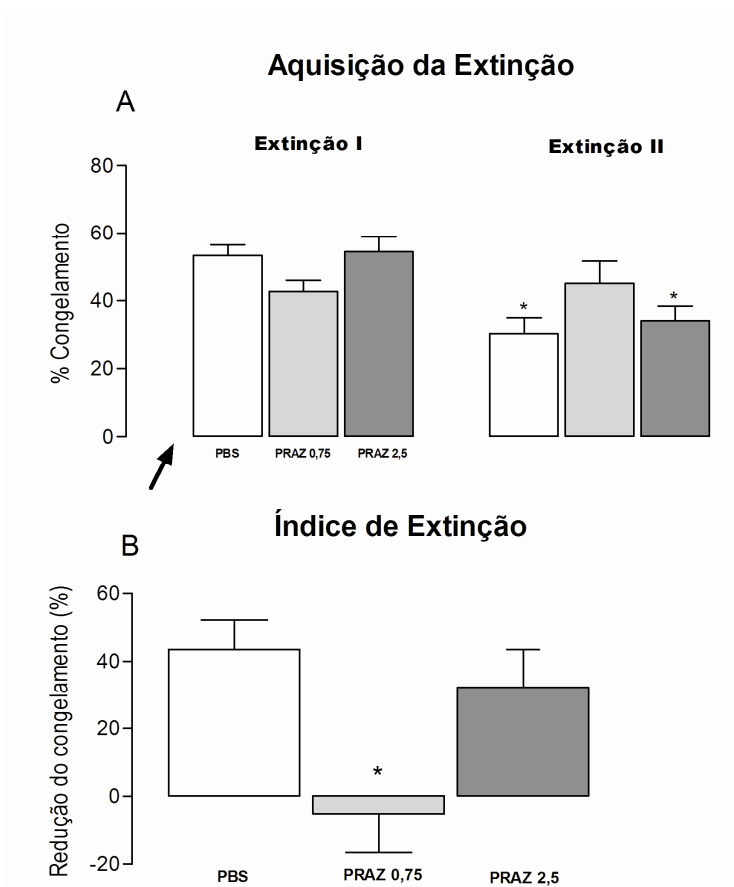


A análise subsequente utilizando o teste Duncan revelou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no comportamento de congelamento, da primeira para a segunda sessão de extinção, no grupo controle tratado com PBS (Fig. 13A). Esta redução na porcentagem do tempo de congelamento não foi observada quando os animais foram microinjetados com o bloqueador alfa-1-adrenérgico prazosin (0,75 nmol) dez minutos antes da sessão de extinção 1 (Fig. 13A). De fato, a análise de variância de uma via seguida de teste Duncan, demonstrou uma redução significativa ( $F_{(2,28)} = 6.29$ ;  $p < 0,01$ ) no parâmetro índice de extinção para este grupo, em comparação ao grupo controle microinjetado com PBS (Fig. 13B).

A partir desta etapa do estudo, o modelo de condicionamento olfatório foi utilizado para avaliar o envolvimento do sistema noradrenérgico nos mecanismos de reconsolidação. Este modelo foi selecionado para permitir uma avaliação detalhada das respostas defensivas emitidas pelos animais diante do estímulo condicionado, em um contexto diferente daquele no qual ocorreu a sessão de reativação. Uma pista olfatória foi selecionada como estímulo neutro, tendo em vista a relevância biológica do sentido da olfação para os ratos. Os resultados a seguir (experimentos 8, 9 e 10) demonstram os efeitos da administração de compostos noradrenérgicos após uma sessão de reativação do medo condicionado olfatório em ratos avaliados em uma caixa de odor.

*Experimento 8: Efeitos da administração sistêmica aguda de propranolol, prazosin ou salina durante a fase de reconsolidação do medo condicionado olfatório.*

Os efeitos da injeção aguda de propranolol (10 ou 20 mg/Kg), prazosin (0,5 ou 1,5 mg/Kg) ou salina, imediatamente após a sessão de reativação do condicionamento olfatório de medo, foram avaliados sete dias após em uma caixa distinta daquela utilizada para o condicionamento. Conforme visualizado na figura 14, os resultados obtidos durante a sessão de familiarização foram agrupados e representados através da média  $\pm$  limite de confiança para 95% da população, através de barras horizontais hachuradas, uma vez que não foram visualizadas diferenças significativas entre os distintos grupos em nenhum dos parâmetros observados.



**Figura 13.** A) Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle) ou prazosin (0,75 ou 2,5 nmol), dez minutos antes da primeira sessão de extinção (aquisição da extinção), na porcentagem do tempo de congelamento em ratos submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual durante dois dias consecutivos (dez minutos cada sessão). Legenda: \*  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo na sessão de extinção 1.  $\uparrow$ = momento da injeção. B) Índice de extinção representado pela porcentagem de redução do tempo de congelamento da primeira para a quarta sessão de extinção. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 9-12 por grupo).

Nenhum dos grupos experimentais exibiu respostas defensivas na caixa de odor durante a sessão de familiarização, sugerindo que os animais não generalizaram o medo condicionado quando expostos a um contexto diferente (Fig. 14).

Durante a sessão de teste, a análise de variância de uma via detectou diferenças significativas entre os diferentes grupos em relação aos parâmetros porcentagem de tempo de aproximação [ $F_{(6,56)} = 7,82$ ;  $p < 0,00001$ ], porcentagem de tempo escondido [ $F_{(6,56)} = 7,84$ ;  $p < 0,00001$ ], número de aproximações [ $F_{(6,56)} = 6,64$ ;  $p < 0,0001$ ] e tempo de head-out [ $F_{(6,56)} = 4,43$ ;  $p < 0,001$ ].

O teste Duncan *a posteriori* detectou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros porcentagem de tempo de aproximação e número de aproximações, associado com uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de tempo escondido, em ambos os grupos tratados com prazosin, quando comparados ao grupo salina ou ao grupo não-reativado tratado com prazosin. Em adição, o teste Duncan revelou ainda um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no tempo de head-out nos animais tratados com propranolol na dose de 10 mg/Kg, quando comparados aos animais controles (Fig. 14).

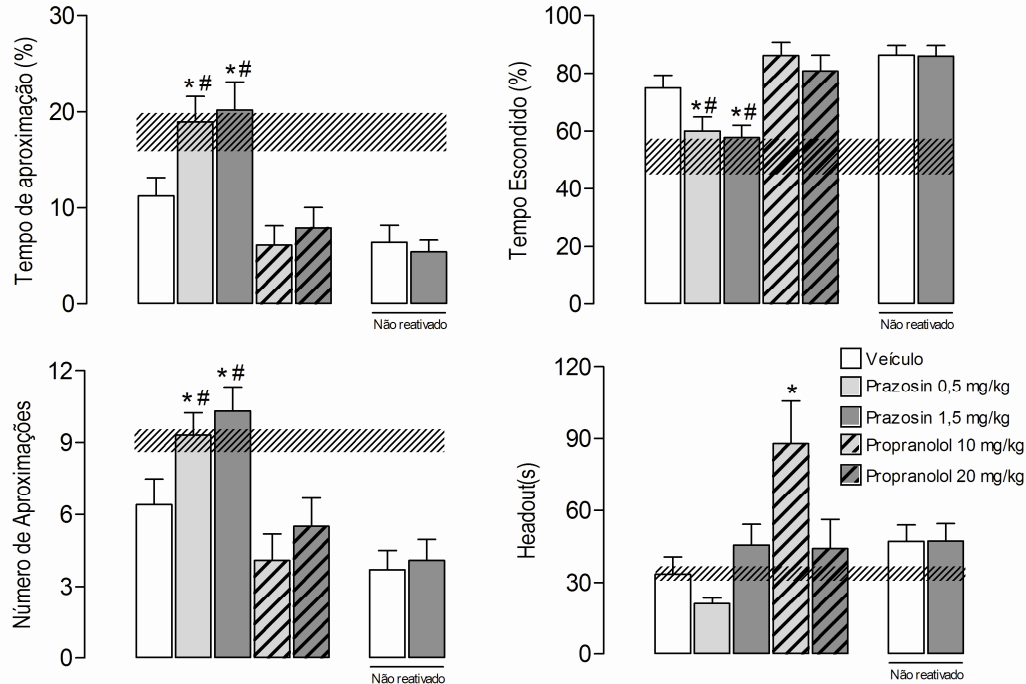
*Experimento 9: Efeitos da microinjeção de PBS ou prazosin nas porções dorsal e ventral do CPFm durante a fase de reconsolidação do medo condicionado olfatório.*

A resposta defensiva de ratos microinjetados com PBS ou prazosin (0,75 ou 1,5 nmol) nas porções dorsal ou ventral do CPFm, imediatamente após a sessão de reativação do medo condicionado olfatório, foi avaliada após sete dias em uma caixa de odor. Conforme ilustrado nas figuras 15 e 16, os valores obtidos na sessão de familiarização foram agrupados e representados através da média  $\pm$  limite de confiança para 95% da população, sendo expressos nos gráficos através de barras horizontais hachuradas, uma vez que não foram visualizadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados.

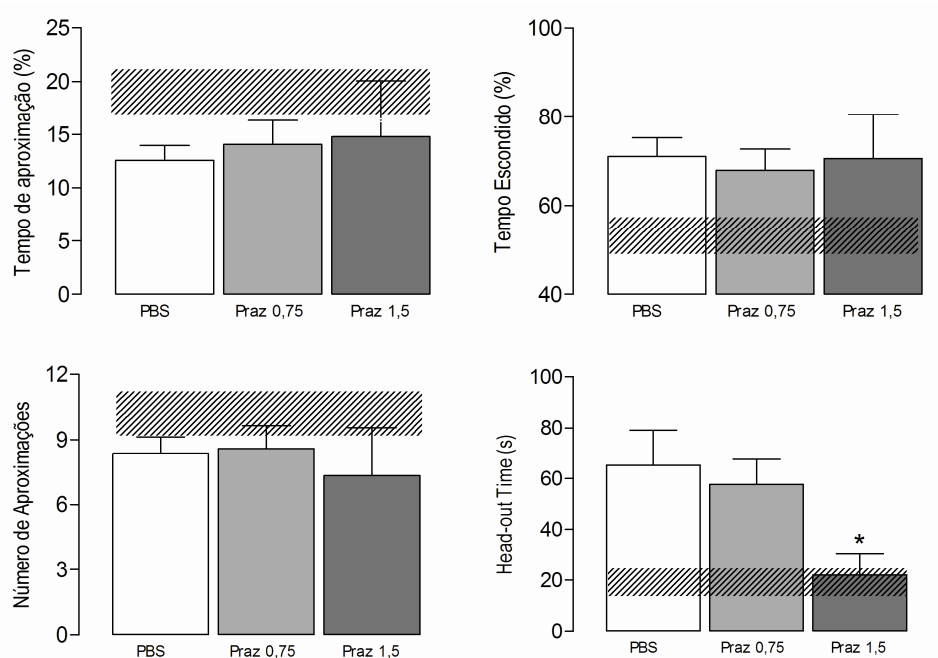
A ausência de respostas defensivas na caixa de odor durante a sessão de familiarização sugeriu que os animais não generalizaram o medo condicionado quando expostos a um contexto diferente. Durante a sessão de teste, a análise de variância de uma via seguida do teste

Duncan, detectou uma redução significativa [ $F_{(2,21)} = 3,41$ ;  $p \leq 0,05$ ] apenas no parâmetro tempo de head-out no grupo microinjetado com prazosin (1,5 nmol) na porção dorsal do CPFm, quando comparado ao grupo tratado com PBS (Fig. 15).

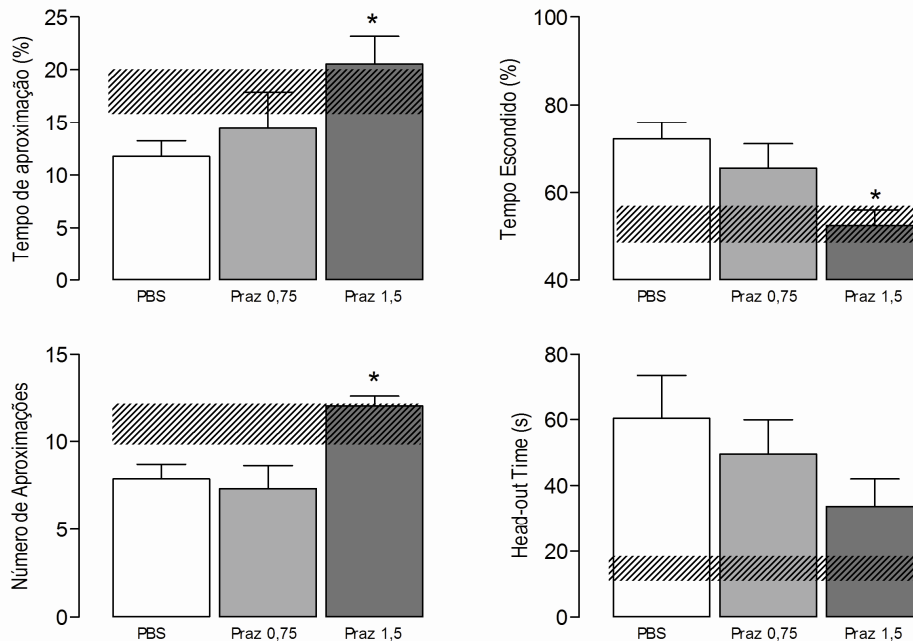
Em relação aos grupos microinjetados nas porções ventrais do CPFm, a análise de variância de uma via revelou uma diferença significativa para os parâmetros porcentagem de tempo de aproximação [ $F_{(2,18)} = 3,46$ ;  $p \leq 0,05$ ], porcentagem de tempo escondido [ $F_{(2,18)} = 5,18$ ;  $p < 0,05$ ] e número de aproximações [ $F_{(2,18)} = 6,54$ ;  $p < 0,01$ ]. O teste Duncan realizado posteriormente demonstrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de tempo de aproximação e no número de aproximações, associado a uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de tempo escondido, no grupo microinjetado com prazosin (1,5 nmol), comparado ao grupo PBS (Fig. 16)



**Figura 14.** Efeitos da injeção sistêmica de veículo, prazosin (0,5 ou 1,5 mg/Kg IP) ou propranolol (10 ou 20 mg/Kg IP), imediatamente após a sessão de reativação (fase de reconsolidação), na expressão do medo condicionado olfatório avaliado sete dias após na caixa de odor. Os parâmetros comportamentais: porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido, número de aproximações e tempo de head-out foram registrados por dez minutos durante as sessões de familiarização (sem odor presente) e teste (odor condicionado presente) e posteriormente analisados. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo veículo; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo não reativado tratado com prazosin. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 8-10 por grupo).



**Figura 15.** Efeitos da microinjeção intra-CPFdm de PBS (controle) ou prazosin (0,75 ou 1,5 nmol), imediatamente após a sessão de reativação (fase de reconsolidação), na expressão do medo condicionado olfatório avaliado sete dias após na caixa de odor. Os parâmetros comportamentais: porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido, número de aproximações e tempo de head-out foram registrados por dez minutos durante as sessões de familiarização (sem odor presente) e teste (odor condicionado presente) e posteriormente analisados. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 6-10 por grupo).



**Figura 16.** Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle) ou prazosin (0,75 ou 1,5 nmol), imediatamente após a sessão de reativação (fase de reconsolidação), na expressão do medo condicionado olfatório avaliado sete dias após na caixa de odor. Os parâmetros comportamentais: porcentagem de tempo de aproximação, porcentagem de tempo escondido, número de aproximações e tempo de head-out foram registrados por dez minutos durante as sessões de familiarização (sem odor presente) e teste (odor condicionado presente) e posteriormente analisados. Legenda: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 6-9 por grupo).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a influência dos receptores beta- e alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de extinção em ratos submetidos ao paradigma do medo condicionado contextual. Esta interferência cognitiva do sistema noradrenérgico sobre a etapa de aquisição da extinção parece ser mediada pelas porções ventrais do CPFm, uma vez que a microinjeção direta de compostos noradrenérgicos nesta estrutura, interferiu de maneira significativa neste processo. Em adição, os receptores alfa-1-adrenérgicos parecem exercer ainda um papel chave nos mecanismos de reconsolidação de memórias aversivas, conforme visualizado no modelo de condicionamento olfatório de medo. De maneira similar ao que ocorre nos processos de aquisição da extinção, o CPFvm parece ser um substrato neuroanatômico importante na mediação destes efeitos.

Sabe-se que compostos noradrenérgicos apresentam efeitos bem descritos no sistema cardiovascular, os quais podem interferir de maneira significativa na atividade locomotora dos animais dependendo das doses utilizadas. Assim sendo, um estudo inicial realizado em ratos anestesiados permitiu a seleção de doses apropriadas para os fármacos utilizados nos experimentos comportamentais.

Ambos os antagonistas adrenérgicos, propranolol 10 mg/Kg ou prazosin 0,5 mg/Kg, foram capazes de bloquear, respectivamente, a taquicardia induzida pela administração de isoproterenol ou o aumento da pressão arterial provocado pela injeção de fenilefrina, sem interferir nos valores basais para estes parâmetros. Em adição, não foram observados efeitos residuais 24 horas após a administração repetida destes antagonistas, uma vez que as variações nos valores de frequência cardíaca e pressão arterial, respectivamente após a injeção de isoproterenol ou fenilefrina, foram similares entre os grupos tratados e controles (Fig. 3 e 4). Estes achados sugerem que as diferenças comportamentais, observadas durante o último dia de extinção, foram decorrentes de interferências cognitivas das drogas durante as sessões prévias de extinção, descartando a possibilidade de efeitos residuais.

A administração sistêmica aguda de compostos beta-adrenérgicos antes da primeira sessão de extinção, não foi capaz de alterar os processos de extinção (Fig.5). Estes achados estão em concordância com estudos prévios mostrando uma falta de efeitos após a injeção aguda do bloqueador beta-adrenérgico propranolol em camundongos expostos ao modelo de extinção do medo condicionado



contextual (Cain et al 2004) ou em ratos expostos ao paradigma de extinção do medo condicionado auditivo (Rodriguez-Romaguera et al 2009). Uma vez que os minutos iniciais da primeira sessão de extinção são também considerados uma fase de evocação da memória, uma análise estatística dos primeiros três ou cinco minutos desta sessão avaliou a possível interferência destes compostos na evocação da memória de medo contextual. A figura I (ver apêndice) demonstra que a administração de agonistas ou antagonistas beta-adrenérgicos, antes da primeira sessão de extinção, não foi capaz de alterar a porcentagem do tempo de congelamento durante os primeiros três ou cinco minutos desta sessão, descartando a possibilidade de efeitos destes fármacos nos processos de evocação do medo condicionado contextual.

No entanto, quando o propranolol foi administrado de maneira repetida, antes ou após as sessões de extinção, ou quando o agonista beta-adrenérgico isoproterenol foi injetado imediatamente após as sessões de extinção, os animais exibiram uma modificação nos padrões de extinção. Enquanto o tratamento com propranolol (10 mg/Kg) prejudicou a aquisição e a consolidação da extinção; a administração de isoproterenol em ambas as doses utilizadas facilitou a consolidação deste processo (Fig. 6 e 7). Estes resultados concordam com estudos prévios nos quais camundongos com deleção gênica da enzima dopamina-beta-hidroxilase – responsável pela síntese de noradrenalina – ou camundongos selvagens tratados com um antagonista beta-adrenérgico, ambos exibiram um prejuízo nos processos de aquisição e consolidação da extinção do medo condicionado contextual (Ouyang & Thomas 2005).

Doses maiores dos compostos noradrenérgicos foram selecionadas durante a etapa de consolidação da extinção, uma vez que alguns estudos têm demonstrado que os processos de consolidação envolvem uma janela temporal crítica, na qual diferentes neurotransmissores e estruturas cerebrais estão envolvidas (McGaugh 2000; Sara et al 1999). Embora a administração destes compostos durante a fase de consolidação da extinção possibilite a avaliação dos efeitos exclusivamente sobre esta etapa, a administração durante o período de aquisição impede uma maior distinção entre os processos de aquisição e consolidação da extinção, uma vez que os efeitos farmacológicos destas drogas persistem durante e após a sessão de extinção. Assim sendo, interferências ocasionadas pela injeção de fármacos durante a fase de aquisição da extinção, não permitem excluir um possível envolvimento da etapa de consolidação da extinção.

O bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos tem sido associado com um prejuízo nas etapas de aquisição (Do Monte et al 2008) e consolidação (Adamec et al 2007) de memórias aversivas. No presente estudo, os receptores beta-adrenérgicos mostraram-se implicados também com os processos de extinção destas memórias, dando suporte a hipótese fundamentada para o presente trabalho de que antagonistas beta-adrenérgicos que prejudicam os processos cognitivos poderiam impedir também os mecanismos de extinção. De fato, estes resultados seriam esperados se considerarmos uma série de evidências encontradas na literatura, demonstrando que os mecanismos de extinção envolvem um novo aprendizado, o qual inibe ou mascara o medo condicionado original (Bouton 2004).

O grupo de animais tratado com isoproterenol 2,5 mg/Kg antes das sessões de extinção não demonstrou uma redução significativa na porcentagem de congelamento da primeira para a terceira sessão de extinção, conforme foi observado no grupo salina. Porém, este achado sugere um efeito ansiogênico deste composto, o qual tem sido bem descrito na literatura (Pohl et al 1985; Pohl et al 1988). De fato, é possível excluir um prejuízo nos mecanismos de aquisição da extinção neste grupo, uma vez que o tempo de congelamento durante a última sessão de extinção, bem como o parâmetro índice de extinção, encontrou-se similar ao do grupo controle (Fig. 6).

Em seguida, uma investigação imunoistoquímica da expressão de proteína Fos no CPFvm, um sistema neural em potencial para a modulação noradrenérgica, foi realizada após a primeira e a última sessão de extinção. O CPFvm tem sido amplamente descrito como uma estrutura chave nos mecanismos de extinção de memórias aversivas (Laurent & Westbrook 2009; Sotres-Bayon et al 2006). Os resultados imunoistoquímicos revelaram um aumento no número de células imunorreativas positivas para Fos no CPFvm dos grupo salina, após a primeira sessão de extinção, quando comparado ao grupo controle mantido na caixa moradia. Um aumento na atividade da proteína Fos nesta estrutura tem sido associado à extinção do medo condicionado (Santini et al 2004). De fato, esta imunorreatividade elevada para a proteína Fos visualizada no grupo salina após a primeira sessão de extinção, foi significativamente reduzida após a última sessão, sugerindo que uma atividade aumentada desta estrutura parece estar associada com os estágios iniciais do processo de extinção.

Ratos tratados com propranolol demonstraram uma redução no número de células positivas para Fos após a primeira sessão de extinção,

quando comparados ao grupo salina. Em adição, diferente do grupo salina, o número de células imunorreativas neste grupo não reduziu da primeira para a última sessão de extinção. Uma vez que os mecanismos de extinção têm sido correlacionados com um aumento na atividade do CPFvm, a imunorreatividade reduzida no CPFvm após a primeira sessão de extinção e a ausência de diferenças no número de células positivas para Fos entre a primeira e a última sessão visualizadas no grupo propranolol, podem estar associadas com os prejuízos na extinção do medo condicionado contextual observados neste grupo.

Assim como ocorreu com o grupo tratado com propranolol, ratos administrados com isoproterenol também demonstraram uma redução na expressão de proteína Fos no CPFvm após a primeira sessão de extinção, quando comparados ao grupo salina. No entanto, estes animais demonstraram um índice de extinção semelhante ao grupo salina, sugerindo que esta redução da imunorreatividade no CPFvm possa estar associada com as propriedades ansiogênicas previamente reportadas para este composto, as quais poderiam estar temporariamente agindo contra os mecanismos de extinção. De fato, apesar desta redução após a primeira sessão de extinção, um aumento na expressão de proteína Fos foi observado após a última sessão, quando o grupo tratado com isoproterenol foi exposto ao contexto sem o efeito de drogas.

Levando em consideração o envolvimento dos receptores beta-adrenérgicos nos mecanismos de extinção de memórias aversivas, uma etapa subsequente do presente estudo avaliou a potencial participação dos receptores alfa-1-adrenérgicos nestes processos. A administração sistêmica repetida de prazosin 0,5 mg/Kg foi capaz de prejudicar a aquisição da extinção, conforme demonstrado ao longo das sessões de extinção ou através do parâmetro índice de extinção (Fig. 9), em comparação ao grupo controle. Isto indica que, enquanto a porcentagem de congelamento do primeiro para o quarto dia de extinção foi reduzida para os grupos tratados com veículo ou prazosin 0,1 mg/Kg antes das sessões de extinção, a mesma manteve-se constante para o grupo que recebeu prazosin na dose de 0,5 mg/Kg. Em adição, conforme ilustrado na figura II (ver apêndice), a administração do antagonista alfa-1-adrenérgico prazosin, antes da primeira sessão de extinção, não foi capaz de alterar a porcentagem do tempo de congelamento durante os primeiros três ou cinco minutos desta sessão, descartando a possibilidade de efeitos destes fármacos nos processos de evocação do medo condicionado contextual.

Embora o tratamento com prazosin 0,5 mg/Kg antes das sessões de extinção tenha prejudicado os processos de aquisição da extinção, doses similares ou maiores deste composto, quando administradas imediatamente após as sessões de extinção, não foram capazes de interferir com os mecanismos de consolidação deste processo (Fig. 10).

Apesar do presente estudo ser o primeiro demonstrando um papel para os receptores alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de extinção do medo condicionado em animais de laboratório, outros achados têm evidenciado uma participação essencial destes receptores em uma série de tarefas envolvendo processos mnemônicos. Em um destes trabalhos, Riekkinen e colaboradores (Riekkinen et al 1996) relataram um prejuízo na aquisição de memórias espaciais em ratos tratados com prazosin. Em outro estudo mais recente, Manion e colaboradores (Manion et al 2007) demonstraram que a administração de prazosin, antes da exposição a um evento estressante, foi capaz de bloquear a potencialização da resposta de sobressalto acústico em ratos, impedindo desta forma o aparecimento de uma resposta defensiva exagerada.

Uma etapa posterior deste estudo avaliou a participação direta dos receptores beta- e alfa-1-adrenérgicos presentes no CPFvm nos mecanismos de extinção do medo condicionado contextual. O CPFvm, conforme previamente mencionado, tem sido descrito como uma estrutura fundamental nos mecanismos de extinção do medo (Laurent & Westbrook 2009; Sotres-Bayon et al 2006). Esta região recebe densas projeções noradrenérgicas do locus coeruleus (Aston-Jones et al 1985; Robbins 1984), além de apresentar uma alta concentração de receptores beta-1- (Rainbow et al 1984) e alfa-1-adrenérgicos (Day et al 1997); e uma imunorreatividade elevada para a enzima dopamina-beta-hidroxilase (Oropeza et al 2007).

Nesta parte do estudo, o antagonista beta-1-adrenérgico atenolol foi usado no lugar do propranolol, uma vez que o mesmo é destituído de efeitos serotoninérgicos (Costain & Green 1978) e apresenta uma maior seletividade para os receptores beta-1-adrenérgicos (Smith & Teitler 1999). Enquanto ratos tratados sistemicamente com salina levaram cerca de três ou quatro sessões de extinção para apresentar uma redução significativa no tempo de congelamento, o grupo PBS, previamente submetido à cirurgia estereotáxica, necessitou de apenas duas sessões de dez minutos para exibir uma redução neste comportamento. Estas diferenças podem estar associadas a possíveis alterações no sistema de neurotransmissão em decorrência do uso de anestésicos gerais ou da

manipulação cirúrgica antes dos testes experimentais, embora outros estudos sejam necessários para esclarecer com maior clareza o que de fato poderia conduzir a estas distinções.

Os resultados demonstraram que a microinjeção do agonista beta-adrenérgico isoproterenol (40 nmol), dez minutos antes da primeira sessão de extinção, foi capaz de reduzir a porcentagem do tempo de congelamento nesta mesma sessão (Fig. 11A). Como não foram detectadas diferenças estatísticas durante a fase de evocação (ver figura III em apêndice), a redução na porcentagem do tempo de congelamento no grupo isoproterenol durante a primeira sessão foi atribuído a um efeito sobre os processos de extinção ao longo desta mesma sessão. Reforçando esta sugestão, a atenuação do comportamento de congelamento foi mantida 24 horas após a primeira sessão de extinção, quando os mesmos animais foram re-expostos ao modelo na ausência de drogas.

Estudos prévios têm demonstrado que há um aumento da transmissão noradrenérgica em ratos expostos a situações de medo (Feenstra et al 2001; Hugues & Garcia 2007). O presente estudo demonstrou que a ativação beta-adrenérgica do CPFvm parece modular positivamente a extinção do medo condicionado contextual. Desta forma, é possível sugerir que uma atividade noradrenérgica aumentada frente a eventos traumáticos poderia estar implicada nos processos de aprendizado da extinção, como um mecanismo defensivo intrínseco para evitar o desenvolvimento de memórias aversivas duradouras. De acordo com esta idéia, Mueller e colaboradores (Mueller et al 2008) demonstraram que o bloqueio beta-adrenérgico no CPFvm prejudica os processos de aquisição da extinção no paradigma do condicionamento de medo auditivo.

Embora a microinjeção intra-CPFvm de atenolol (40 nmol) não tenha alterado a porcentagem do tempo de congelamento na primeira sessão de extinção, a mesma foi capaz de inibir os efeitos do isoproterenol durante as sessões de extinção. Este achado sugere que os efeitos facilitatórios da microinjeção de isoproterenol no CPFvm, durante a fase de aquisição da extinção, foram mediados pela ativação dos receptores beta-1-adrenérgicos presentes nesta estrutura.

Em adição, a microinjeção isolada de atenolol na dose mais alta, antes da primeira sessão de extinção, não alterou de forma significativa a porcentagem do tempo de congelamento nesta mesma sessão, porém impediu a redução desta resposta durante a segunda sessão de extinção (Fig. 11A). Assim sendo, a reversão dos efeitos do isoproterenol,

observada na última sessão de extinção, após a microinjeção prévia de atenolol, pode ter sido decorrente ainda de um antagonismo fisiológico entre estes compostos.

Concordando com um envolvimento dos receptores beta-adrenérgicos do CPFvm nos mecanismos de extinção, Mueller e colaboradores (Mueller et al 2008), em um estudo utilizando o condicionamento auditivo de medo em ratos, demonstraram que o bloqueio destes receptores antes da aquisição da extinção, não alterou a resposta de congelamento dentro da mesma sessão, porém ocasionou um prejuízo na retenção da extinção em uma sessão de teste realizada 24 horas após.

Em contraste com os resultados obtidos na etapa de aquisição da extinção, a manipulação dos receptores beta-adrenérgicos do CPFvm imediatamente após a primeira sessão de extinção, não interferiu nos processos de consolidação da extinção do medo contextual (Fig. 12). Estes achados corroboram mais uma vez os estudos prévios obtidos por Mueller e colaboradores (Mueller et al 2008), os quais demonstraram que o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos imediatamente após a sessão de extinção, não foi capaz de prejudicar a consolidação da extinção em um protocolo de extinção do medo condicionado auditivo em ratos. Desta forma, nossos resultados fornecem evidências de que o aumento na atividade dos receptores beta-1-adrenérgicos do CPFvm facilita os mecanismos de aquisição da extinção, enquanto o bloqueio destes receptores parece interferir de maneira negativa neste processo. Em contrapartida, os efeitos sobre os mecanismos de consolidação da extinção do medo contextual, visualizados após a injeção sistêmica de compostos beta-adrenérgicos, parecem não ser mediados pelo CPFvm, uma vez que a microinjeção de compostos beta-adrenérgicos diretamente nesta estrutura não interferiu nestes processos.

De maneira semelhante ao tratamento sistêmico, a microinjeção intra-CPFvm de prazosin (0,75 nmol) reduziu de maneira significativa o índice de extinção, em comparação ao grupo controle, indicando um prejuízo nos mecanismos de aquisição da extinção. Enquanto a porcentagem do tempo de congelamento foi significativamente reduzida da primeira para a segunda sessão de extinção nos grupos controle e prazosin (2,5 nmol); não foram visualizadas diferenças para este parâmetro entre as sessões de extinção para os animais microinjetados com prazosin na dose de 0,75 nmol (Fig. 13).

A ausência de efeitos nos processos de extinção, visualizada com a dose mais alta de prazosin, pode ter sido atribuída a uma perda de

seletividade desta droga quando utilizada em doses mais altas. Regan e colaboradores (Regan et al 1988) relatam que doses elevadas de prazosin podem ocasionar um bloqueio dos receptores alfa-2- adrenérgicos. Estes receptores, presentes em número elevado na pré-sinapse, quando ativados ocasionam uma redução na liberação de noradrenalina na fenda sináptica (Langer 1980). Desta forma, o bloqueio destes receptores inibitórios promoveria um aumento da transmissão noradrenérgica, facilitando os mecanismos de extinção através da ativação dos receptores beta-1-adrenérgicos, conforme previamente descrito neste trabalho. De fato, alguns estudos têm demonstrado uma facilitação no processo de extinção após a administração de antagonistas alfa-2-adrenérgicos (Cain et al 2004; Morris & Bouton 2007).

Em adição, conforme ilustrado na figura IV (ver apêndice), a microinjeção do antagonista alfa-1-adrenérgico prazosin, antes da primeira sessão de extinção, não alterou a porcentagem do tempo de congelamento durante os primeiros três ou cinco minutos desta sessão, descartando quaisquer efeitos dos receptores alfa-1-adrenérgicos do CPFvm nos processos de evocação do medo condicionado contextual.

Evidências na literatura têm demonstrado que o CPFm modula os componentes cardiovasculares da resposta defensiva no paradigma do medo contextual (Resstel et al 2008). Enquanto a estimulação química do CPFm foi capaz de ocasionar um aumento na pressão arterial e na frequência cardíaca (Verberne 1996); a inativação farmacológica temporária desta estrutura reduziu estes parâmetros durante a sessão de evocação do medo contextual (Resstel et al 2006). Embora um papel para o CPFm tenha sido descrito durante a etapa de expressão do medo condicionado contextual, mudanças nos parâmetros cardiovasculares não foram observadas após a lesão excitotóxica (Fryszak & Neafsey 1994) ou o bloqueio dos receptores alfa-1-adrenérgicos (Resstel et al 2005) nesta estrutura em ratos não-estressados. Estas evidências reforçam a idéia de que o CPFm não apresenta uma influência tônica na atividade cardiovascular. Por esta razão, e também porque a infusão de prazosin no CPFvm não interferiu com o comportamento de congelamento durante a primeira sessão de extinção, possíveis alterações nos parâmetros cardiovasculares após o bloqueio dos receptores alfa-1-adrenérgicos nesta região não foram investigadas no presente estudo.

Estudos prévios têm demonstrado que o CPFvm envia projeções robustas para a amígdala (McDonald et al 1996; Pare et al 2004), uma estrutura complexa que desempenha um papel importante na aquisição e na expressão das repostas de medo condicionado (LeDoux 2000). Esta via

neural que parte do CPFvm tem como alvo principal as células intercaladas da amígdala, um núcleo de neurônios gabaérgicos localizado entre as porções central e basolateral da amígdala, as quais são responsáveis pelo controle inibitório dos neurônios de saída da amígdala central (Berretta et al 2005; Likhtik et al 2008).

Desta forma, o prejuízo na extinção do medo condicionado contextual após a administração de atenolol ou prazosin diretamente no CPFvm, pode ser atribuído a um bloqueio da ativação desta estrutura sobre as células intercaladas da amígdala, resultando na expressão exacerbada do medo condicionado durante a sessão de extinção. De maneira oposta, a administração de isoproterolol intra-CPFvm estaria estimulando as células intercaladas da amígdala, conduzindo desta forma a uma redução da expressão do medo condicionado e conseqüente facilitação dos processos de extinção.

Em adição, projeções descendentes do CPFvm para o hipocampo e para a substância cinzenta periaquedutal também têm sido descritas (Vertes 2004). Como estas estruturas têm sido respectivamente relacionadas com as informações contextuais do evento aversivo (Anagnostaras et al 2001) e com os aspectos fisiológicos e comportamentais da resposta de medo condicionado (Vianna et al 2001), interferências do CPFvm sobre estas regiões poderiam estar também envolvidas na modulação da extinção do medo condicionado contextual (Ji & Maren 2007; McNally et al 2004).

Relatos clínicos em humanos e estudos experimentais em animais de laboratório têm fornecido suporte para a hipótese de que drogas que inibem os processos mnemônicos prejudicam a extinção de memórias de medo (Cain et al 2004; Mueller & Cahill ; Mueller et al 2008); enquanto fármacos que aumentam as funções cognitivas facilitam este mecanismo (Powers et al 2009; Ressler et al 2004; Wrubel et al 2007). Concordando com esta sugestão, os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento sistêmico repetido ou a microinjeção intra-CPFvm de bloqueadores beta- ou alfa-1- adrenérgicos, os quais são descritos por prejudicarem a formação de memórias em diferentes modelos animais (Riekkinen et al 1996; Sirvio & MacDonald 1999; Zarrindast et al 2002), prejudicam também os mecanismos de extinção de memórias aversivas.

Considerando os presentes achados e tendo em vista que ambos os compostos, propranolol e prazosin, têm sido amplamente prescritos como tratamentos paliativos para a remissão dos sintomas em pacientes com TEPT (Henry et al 2007; Raskind et al 2007; Taylor et al 2008; Vaiva et



al 2003), é possível sugerir que a utilização destes fármacos em indivíduos que estão sendo submetidos à terapia de exposição, poderia reduzir drasticamente os benefícios da mesma.

Uma etapa posterior do presente estudo avaliou os efeitos da administração de prazosin ou propranolol nos mecanismos de reconsolidação do medo condicionado olfatório. Os resultados demonstraram que a administração sistêmica de prazosin em ambas as doses utilizadas, imediatamente após a sessão de reativação, foi capaz de reduzir a resposta comportamental defensiva avaliada durante a fase de teste, em comparação ao grupo controle. Esta atenuação da resposta de medo foi caracterizada por uma diminuição na porcentagem do tempo escondido e um aumento na porcentagem do tempo de aproximação e no número de aproximações à fonte do odor condicionado aversivo.

De acordo com a literatura, um critério necessário para considerar um prejuízo sobre os processos de reconsolidação, é que a droga administrada interfira na memória original somente nos casos em que esta memória for previamente reativada (Nader 2003). Assim sendo, é possível sugerir uma participação dos receptores alfa-1-adrenérgicos nos mecanismos de reconsolidação do medo condicionado olfatório, uma vez que os animais que receberam prazosin sem terem sido previamente expostos a sessão de reativação, não demonstraram alterações na resposta defensiva durante o teste (Fig. 14).

A observação deste resultado, demonstrando um efeito amnésico do prazosin nos processos de reconsolidação do medo, em conjunto com os achados prévios revelando um prejuízo nos mecanismos de extinção de memórias aversivas, dá suporte à hipótese anterior de que o tempo da sessão de evocação é crucial para definir o destino de uma memória. Bustos e colaboradores (Bustos et al 2006) acreditam que se estas evidências ocorrem de fato em humanos, um controle temporal sobre as terapias cognitivas, associado a uma correta intervenção farmacológica, poderia se tornar uma ferramenta valiosa para o tratamento de pacientes que experienciaram eventos emocionais traumáticos. De fato, estudos pré-clínicos bastante recentes têm apostado em tal terapia (Brunet et al 2008; Taubenfeld et al 2009; Tollenaar et al 2009b).

Embora a administração de prazosin tenha interferido de maneira significativa nos processos de reconsolidação da memória, o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos com propranolol após a sessão de reativação não modificou a resposta comportamental

defensiva durante o teste, em comparação ao grupo controle. Um aumento no tempo de head-out - caracterizado como um comportamento de avaliação de risco - foi observado neste grupo durante o teste. No entanto, a observação isolada deste parâmetro não fornece maiores informações acerca do estado emocional do animal.

Alguns autores têm demonstrado que o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos parece prejudicar os processos de reconsolidação de memórias aversivas em animais de laboratório (Abrari et al 2008; Debiec & Ledoux 2004; Przybylski et al 1999; Roullet & Sara 1998). No entanto, no presente estudo, a administração de propranolol em doses similares parece não ter interferido de maneira significativa nestes processos.

Sabe-se que a utilização de modelos experimentais distintos envolvendo memórias de medo pode ocasionar a ativação de estruturas neurais ou sistemas de neurotransmissão bastante diferenciados (Ambrogio Lorenzini et al 1999). Desta forma, uma explanação para justificar a ausência de efeitos do propranolol neste estudo seria a utilização de um protocolo experimental distinto dos demais. Enquanto aqui a sessão de teste foi realizada em um contexto completamente diferente daquele utilizado durante a sessão de reativação, nos demais estudos, a fase de reativação da memória foi realizada no mesmo aparato posteriormente utilizado para a sessão de teste. Além disto, enquanto estes estudos utilizaram o condicionamento contextual ou auditivo de medo, o presente estudo utilizou uma pista olfatória como estímulo condicionado aversivo.

Estudos pré-clínicos em humanos têm demonstrado uma eficácia do propranolol em reduzir as respostas comportamentais de medo quando o protocolo experimental envolve o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos antes (Kindt et al 2009) ou imediatamente após (Brunet et al 2008) uma sessão curta de evocação. Estes estudos têm sugerido uma eficácia potencial dos bloqueadores beta-adrenérgicos nos processos de reconsolidação de memórias aversivas. Em contrapartida, outros estudos clínicos comparando as respostas fisiológicas – frente a situações emocionais - entre pacientes com TEPT e indivíduos saudáveis, falharam em demonstrar uma eficácia para este fármaco (McGhee et al 2009; Tollenaar et al 2009a).

Afora as possíveis interferências do propranolol nos mecanismos cognitivos que ocorrem após uma sessão de reativação da memória, outro efeito benéfico relacionado ao uso desta droga em pacientes com TEPT tem sido a significante redução dos sintomas presentes, a qual tem sido atribuída aos bem descritos efeitos

ansiolíticos deste composto em humanos (Neumeister et al 2005). Neste cenário, estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos temporais envolvidos durante o processo de evocação, permitindo desta forma um maior controle em relação a direção que uma memória emocional poderá progredir após evocada.

Grande parte dos trabalhos envolvendo um estudo das estruturas neuroanatômicas envolvidas nos processos de reconsolidação tem focado em estruturas como a amígdala e o hipocampo (Nader et al 2000a; Wang et al 2009). Sabe-se que ambos os processos, extinção e reconsolidação, tratam-se de eventos cognitivos que sucedem a etapa de evocação de uma memória. Embora o CPFm tenha sido amplamente descrito como uma estrutura chave na modulação dos mecanismos de extinção de memórias emocionais, estudos avaliando o envolvimento desta região nos processos de reconsolidação de memórias aversivas são bastante restritos e limitam-se a investigar a participação indireta desta estrutura (Mamiya et al 2009).

Algumas evidências sugerem que conexões recíprocas entre o CPFvm e a amígdala basolateral são responsáveis pela modulação de aspectos cognitivos e emocionais (McDonald et al 1996). Enquanto uma atividade basal constante do CPFvm parece inibir a atividade da amígdala; o estresse e os glicocorticóides parecem alterar o funcionamento do CPFm, facilitando assim a ocorrência de respostas defensivas frente a estímulos emocionais (Richter-Levin & Maroun 2010).

Assim sendo, o presente estudo investigou as porções dorsal e ventral do CPFm como possíveis substratos neurais envolvidos na modulação das respostas alfa-1-adrenérgicas observadas durante a reconsolidação do medo condicionado olfatório. Os resultados demonstraram que a microinjeção local de prazosin no CPFdm, imediatamente após a sessão de reativação, não interferiu de maneira significativa na resposta comportamental defensiva avaliada durante a fase de teste, em comparação ao grupo controle. Apesar de uma redução no tempo de head-out, parâmetro que sugere um comportamento de avaliação de risco, ter sido observada no grupo microinjetado com a dose mais alta de prazosin, os demais parâmetros comportamentais defensivos mostraram-se similares ao grupo controle.

De maneira oposta ao que foi observado para as porções dorsais do CPFm, o bloqueio dos receptores alfa-1-adrenérgicos do CPFvm, imediatamente após a sessão de reativação, foi capaz de reduzir de maneira significativa a resposta de defesa observada uma semana após durante a fase de teste. Esta atenuação da resposta de medo foi

caracterizada por uma diminuição na porcentagem do tempo escondido e um aumento na porcentagem do tempo de aproximação e no número de aproximações à fonte do odor condicionado. Estes achados sugerem um envolvimento dos receptores alfa-1-adrenérgicos da porção ventral CPFm, mas não da região dorsal, nos mecanismos de reconsolidação do medo condicionado olfatório. Embora este seja o primeiro estudo demonstrando uma participação direta do CPFvm na etapa de reconsolidação de uma memória aversiva, outros estudos envolvendo memórias de reconhecimento de objetos descreveram um papel desta estrutura nos mecanismos de reconsolidação (Akirav & Maroun 2006; Maroun & Akirav 2009).

Em concordância com os presentes resultados, demonstrando diferenças entre a modulação alfa-1-adrenérgica das porções dorsal e ventral do CPFm durante a fase de reconsolidação, outros trabalhos têm reportado um papel distinto para estas estruturas nas diferentes etapas do processamento de memórias aversivas (Gilmartin & McEchron 2005; Laurent & Westbrook 2009; Vidal-Gonzalez et al 2006). Em um destes estudos, Vidal-Gonzalez e colaboradores (Vidal-Gonzalez et al 2006) demonstraram efeitos opostos na expressão do medo condicionado após a microestimulação elétrica das porções dorsal e ventral do CPFm. Enquanto a microestimulação elétrica do CPFdm provocou um aumento das respostas defensivas, a microestimulação do CPFvm ocasionou uma redução destas respostas. Tendo como base estudos anatômicos (Brinley-Reed et al 1995; Cassell & Wright 1986), os autores associaram estes achados à ocorrência de um mecanismo bidirecional de modulação do medo, no qual as porções dorsal e ventral do CPFm estariam respectivamente, excitando ou inibindo a atividade da amígdala.

Ainda, outras evidências sugerem que conexões recíprocas entre o CPFvm e a amígdala basolateral são responsáveis pela modulação de aspectos cognitivos e emocionais (Maroun & Richter-Levin 2003; Rocher et al 2004). Em um trabalho recente, Richter-Levin & Maroun (Richter-Levin & Maroun 2010) sugerem que uma atividade basal constante do CPFvm inibe a atividade da amígdala; enquanto o estresse e os glicocorticóides parecem alterar o funcionamento do CPFm, facilitando assim a ocorrência de respostas defensivas frente a estímulos emocionais.

Vertes (2004), através de um estudo minucioso avaliando as projeções neurais do CPFm, demonstrou diferenças significativas entre as conexões neuroanatômicas das porções dorsal e ventral desta estrutura. Enquanto a porção dorsal do CPFm emite projeções densas

para o córtex insular, o núcleo accumbens, o tubérculo olfatório, o tálamo e o núcleo da rafe; a porção ventral desta estrutura projeta de maneira bastante significativa para o septo lateral, o núcleo do leito da estria terminal, o núcleo pré-óptico, a substância inornata, o hipotálamo e o núcleo do trato solitário. Ainda, o CPFdm conecta-se com as porções medial do núcleo basal magnocelular, com a porção lateral da amígdala central, com a área amigdalóide anterior e com uma porção restrita da amígdala basolateral; enquanto o CPFvm projeta-se substancialmente para o núcleo superficial da amígdala, a região cortical da amígdala central, a porção acessória do núcleo basal e a porção basolateral da amígdala (McDonald et al 1996).

Achados na literatura têm descrito um envolvimento da porção basolateral da amígdala durante as distintas etapas do condicionamento de medo (Duvarci et al 2008; Lamprecht et al 2009; LeDoux 2003). Esta estrutura parece estar intimamente relacionada com o aprendizado associativo entre um estímulo condicionado e um incondicionado (Maren 2005; Sigurdsson et al 2007). De fato, a lesão eletrolítica ou excitotóxica, assim como o bloqueio farmacológico desta estrutura previne a aquisição e a expressão do medo condicionado (Blair et al 2001; Campeau & Davis 1995; Muller et al 1997; Schafe et al 2005). De acordo com esta proposta, uma série de estudos tem demonstrado um papel fundamental da região basolateral da amígdala também no condicionamento de medo olfatório (Davis 2004; Hegoburu et al 2009; Miranda et al 2007; Sevelinges et al 2009). Em adição, estudos prévios realizados em nosso laboratório têm demonstrado um papel essencial de estruturas hipotalâmicas mediais durante a etapa de evocação do condicionamento olfatório de medo (Canteras et al 2008). Embora o hipotálamo medial receba projeções diretas discretas do CPFvm, conexões indiretas bastante significativas comunicam estas estruturas através do núcleo superior da amígdala (Hurley et al 1991; McDonald et al 1996).

Assim sendo, levando-se em consideração as conexões maciças da porção ventral (mas não da porção dorsal) do CPFm para a amígdala basolateral e para o hipotálamo, é possível sugerir que as interferências sobre os mecanismos de reconsolidação do condicionamento olfatório observadas no presente estudo, possam estar sendo moduladas por uma ação indireta dos receptores alfa-1-adrenérgico do CPFvm sobre estas estruturas. Neste sentido, estudos futuros são necessários para compreender com maior clareza as interferências do CPFvm sobre estas estruturas, bem como a importância desta modulação sobre os processos de reconsolidação de memórias aversivas.

## 6. CONCLUSÃO

- Em concordância com os resultados da literatura, a administração única e aguda de compostos beta-adrenérgicos não foi capaz de interferir nos processos de aquisição da extinção do medo condicionado contextual;

- Enquanto a administração repetida do antagonista beta-adrenérgico propranolol prejudicou as fases de aquisição ou consolidação da extinção do medo condicionado contextual; o agonista beta-adrenérgico isoproterenol facilitou a etapa de consolidação deste processo. Estes achados dão suporte à hipótese do presente estudo, sugerindo que drogas que prejudicam os processos mnemônicos reduzem de fato a ocorrência do fenômeno de extinção;

- De forma semelhante ao que foi descrito para os antagonistas beta-adrenérgicos, o bloqueio repetido dos receptores alfa-1-adrenérgicos com prazosin prejudicou a aquisição da extinção do medo condicionado contextual;

- Uma avaliação imunoistoquímica do CPFvm nas fases iniciais e finais do processo de extinção demonstrou um aumento na atividade neural desta região durante as etapas iniciais deste processo. Estes achados confirmaram o papel chave desta estrutura nos mecanismos de extinção do medo condicionado e estão de acordo com estudos prévios envolvendo outros tipos de condicionamento;

- A microinjeção direta aguda de compostos noradrenérgicos no CPFvm replicou os efeitos observados após o tratamento sistêmico repetido, sugerindo uma participação desta estrutura como substrato neural na mediação dos efeitos noradrenérgicos sobre os processos de extinção do medo condicionado contextual;

- O bloqueio dos receptores alfa-1-adrenérgicos com prazosin após uma sessão de reativação prejudicou a etapa de reconsolidação do medo condicionado olfatório, conforme observado após uma semana durante o teste. Em contrapartida, o mesmo tratamento sem uma sessão de reativação, não foi capaz de interferir neste processo. Estes achados confirmam a hipótese testada de que uma memória previamente consolidada pode retornar a um estado lábil e sofrer influências

farmacológicas, conquanto que a mesma seja reativada com as mesmas pistas que se encontravam presentes durante a fase de aquisição;

- Em contraste com outros estudos, o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos com propranolol após a sessão de reativação não foi capaz de interferir na etapa de reconsolidação desta memória. Estas divergências com a literatura foram atribuídas às diferenças entre os protocolos experimentais utilizados nestes estudos;

- A administração direta de prazosin no CPFvm, mas não no CPFdm, após a sessão de reativação, foi capaz de reduzir as respostas comportamentais defensivas avaliadas após uma semana durante o teste. Estes achados sugerem que os receptores alfa-1-adrenérgicos do CPFvm estão envolvidos na modulação da resposta de medo durante a fase de reconsolidação;

- Em conjunto, comparando os achados do presente estudo com os tratamentos e terapias utilizadas em humanos para aliviar os sintomas do TEPT, é possível sugerir que, quando usados em associação com a terapia de exposição, os antagonista beta- ou alfa-1-adrenérgicos poderiam prejudicar os efeitos benéficos da mesma;

- Em contrapartida, um efeito em potencial do antagonista alfa-1-adrenérgico prazosin, como ferramenta farmacológica nos processos de reconsolidação de memórias aversivas, poderia ser investigado em pacientes com transtornos de ansiedade, incluindo o TEPT. No entanto, ajustes no tempo de evocação durante a terapia de reexposição seriam necessários para simular uma sessão de reativação da memória aversiva nestes pacientes.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abrari K, Rashidy-Pour A, Semnanian S, Fathollahi Y. 2008. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. *Neurobiol Learn Mem* 89:178-84
- Adamec R, Muir C, Grimes M, Pearcey K. 2007. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. *Behav Brain Res* 179:192-207
- Akirav I, Maroun M. 2006. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16:1759-65
- Akirav I, Maroun M. 2007. The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast* 2007:30873
- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-6
- Alberini CM, Milekic MH, Tronel S. 2006. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cell Mol Life Sci* 63:999-1008
- Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. 1999. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* 71:1-18
- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. 2001. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11:8-17
- Antonello A, Hrelia P, Leonardi A, Marucci G, Rosini M, et al. 2005. Design, synthesis, and biological evaluation of prazosin-related derivatives as multipotent compounds. *J Med Chem* 48:28-31
- Artinian J, McGauran AM, De Jaeger X, Mouledous L, Frances B, Roullet P. 2008. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *Eur J Neurosci* 27:3009-19
- Aston-Jones G, Foote SL, Segal M. 1985. Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neuroscience* 15:765-77



- Bahar A, Dorfman N, Dudai Y. 2004. Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *Eur J Neurosci* 19:1115-8
- Barad M. 2005. Fear extinction in rodents: basic insight to clinical promise. *Curr Opin Neurobiol* 15:710-5
- Berretta S, Pantazopoulos H, Caldera M, Pantazopoulos P, Pare D. 2005. Infralimbic cortex activation increases c-Fos expression in intercalated neurons of the amygdala. *Neuroscience* 132:943-53
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. 2001. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8:229-42
- Bouton ME. 2000. A learning theory perspective on lapse, relapse, and the maintenance of behavior change. *Health Psychol* 19:57-63
- Bouton ME. 2004. Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem* 11:485-94
- Bouton ME, Bolles RC. 1979. Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 5:368-78
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. 2006. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* 60:352-60
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, et al. 1995. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 152:973-81
- Brinley-Reed M, Mascagni F, McDonald AJ. 1995. Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: an electron microscopic study in the rat. *Neurosci Lett* 202:45-8
- Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K, Pitman RK. 2008. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 42:503-6
- Bustos SG, Giachero M, Maldonado H, Molina VA. 2009a. Previous Stress Attenuates the Susceptibility to Midazolam's Disruptive Effect on Fear Memory Reconsolidation: Influence of Pre-Reactivation D-Cycloserine Administration. *Neuropsychopharmacology*
- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience* 139:831-42

- Bustos SG, Maldonado H, Molina VA. 2009b. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34:446-57
- Cahill L, Pham CA, Setlow B. 2000. Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem* 74:259-66
- Cahill L, Prins B, Weber M, McGaugh JL. 1994. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 371:702-4
- Cain CK, Blouin AM, Barad M. 2004. Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. *Learn Mem* 11:179-87
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Barros DM, Vianna MR, Izquierdo LA, et al. 2005. Retrieval and the extinction of memory. *Cell Mol Neurobiol* 25:465-74
- Campeau S, Davis M. 1995. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* 15:2312-27
- Canteras NS, Kroon JA, Do-Monte FH, Pavesi E, Carobrez AP. 2008. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1228-35
- Cassell MD, Wright DJ. 1986. Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. *Brain Res Bull* 17:321-33
- Chang CH, Knapska E, Orsini CA, Rabinak CA, Zimmerman JM, Maren S. 2009. Fear extinction in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit8 23
- Cloitre M. 2009. Effective psychotherapies for posttraumatic stress disorder: a review and critique. *CNS Spectr* 14:32-43
- Corcoran KA, Desmond TJ, Frey KA, Maren S. 2005. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J Neurosci* 25:8978-87
- Corcoran KA, Maren S. 2004. Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction. *Learn Mem* 11:598-603

- Costain DW, Green AR. 1978. beta-Adrenoceptor antagonists inhibit the behavioural responses of rats to increased brain 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 64:193-200
- Davidson JR. 2006. Pharmacologic treatment of acute and chronic stress following trauma: 2006. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 2:34-9
- Davis M, Myers KM, Chhatwal J, Ressler KJ. 2006. Pharmacological treatments that facilitate extinction of fear: relevance to psychotherapy. *NeuroRx* 3:82-96
- Davis M, Rainnie D, Cassell M. 1994. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17:208-14
- Davis RL. 2004. Olfactory learning. *Neuron* 44:31-48
- Dawson RG, McGaugh JL. 1969. Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination. *Science* 166:525-7
- Day HE, Campeau S, Watson SJ, Jr., Akil H. 1997. Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 13:115-39
- Debiec J, Ledoux JE. 2004. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129:267-72
- Delamater AR. 2004. Experimental extinction in Pavlovian conditioning: behavioural and neuroscience perspectives. *Q J Exp Psychol B* 57:97-132
- Delgado MR, Nearing KI, Ledoux JE, Phelps EA. 2008. Neural circuitry underlying the regulation of conditioned fear and its relation to extinction. *Neuron* 59:829-38
- Diergaarde L, Schoffelmeer AN, De Vries TJ. 2008. Pharmacological manipulation of memory reconsolidation: towards a novel treatment of pathogenic memories. *Eur J Pharmacol* 585:453-7
- Dierks MR, Jordan JK, Sheehan AH. 2007. Prazosin treatment of nightmares related to posttraumatic stress disorder. *Ann Pharmacother* 41:1013-7
- Do Monte FH, Canteras NS, Fernandes D, Assreuy J, Carobrez AP. 2008. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *J Neurosci* 28:13296-302
- Doyere V, Debiec J, Monfils MH, Schafe GE, LeDoux JE. 2007. Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* 10:414-6

- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51-86
- Duvarci S, Nader K. 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 24:9269-75
- Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. 2008. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem* 15:747-55
- Eisenberg M, Dudai Y. 2004. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *Eur J Neurosci* 20:3397-403
- Evers K. 2007. Perspectives on memory manipulation: using beta-blockers to cure post-traumatic stress disorder. *Camb Q Healthc Ethics* 16:138-46
- Fanselow MS. 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73-81
- Feenstra MG, Vogel M, Botterblom MH, Joosten RN, de Bruin JP. 2001. Dopamine and noradrenaline efflux in the rat prefrontal cortex after classical aversive conditioning to an auditory cue. *Eur J Neurosci* 13:1051-4
- Feldner MT, Monson CM, Friedman MJ. 2007. A critical analysis of approaches to targeted PTSD prevention: current status and theoretically derived future directions. *Behav Modif* 31:80-116
- Ferry B, McGaugh JL. 1999. Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 72:8-12
- Flordellis C, Paris H, Karabinis A, Lymperopoulos A. 2004. Pharmacogenomics of adrenoceptors. *Pharmacogenomics* 5:803-17
- Fryszak RJ, Neafsey EJ. 1994. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Res* 643:181-93
- Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, Villalobos-Molina R. 1999. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 30:449-58
- Gilbertson MW, Shenton ME, Ciszewski A, Kasai K, Lasko NB, et al. 2002. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat Neurosci* 5:1242-7
- Giles J. 2005. Beta-blockers tackle memories of horror. *Nature* 436:448-9

- Gilmartin MR, McEchron MD. 2005. Single neurons in the medial prefrontal cortex of the rat exhibit tonic and phasic coding during trace fear conditioning. *Behav Neurosci* 119:1496-510
- Gold PE, Van Buskirk RB. 1975. Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behav Biol* 13:145-53
- Gold PE, Vogt J, Hall JL. 1986. Glucose effects on memory: behavioral and pharmacological characteristics. *Behav Neural Biol* 46:145-55
- Groenewegen HJ, Uylings HB. 2000. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3-28
- Hegoburu C, Sevelinges Y, Thevenet M, Gervais R, Parrot S, Mouly AM. 2009. Differential dynamics of amino acid release in the amygdala and olfactory cortex during odor fear acquisition as revealed with simultaneous high temporal resolution microdialysis. *Learn Mem* 16:687-97
- Heim C, Nemeroff CB. 2009. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr* 14:13-24
- Henry M, Fishman JR, Youngner SJ. 2007. Propranolol and the prevention of post-traumatic stress disorder: is it wrong to erase the "sting" of bad memories? *Am J Bioeth* 7:12-20
- Hernandez PJ, Sadeghian K, Kelley AE. 2002. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 5:1327-31
- Hofmann SG. 2007. Enhancing exposure-based therapy from a translational research perspective. *Behav Res Ther* 45:1987-2001
- Hugues S, Garcia R. 2007. Reorganization of learning-associated prefrontal synaptic plasticity between the recall of recent and remote fear extinction memory. *Learn Mem* 14:520-4
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L. 2007. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* 14:47-53
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB. 1991. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:249-76
- Introini-Collison IB, McGaugh JL. 1986. Epinephrine modulates long-term retention of an aversively motivated discrimination. *Behav Neural Biol* 45:358-65

- Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. 2006. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci* 26:5733-8
- Ji J, Maren S. 2005. Electrolytic lesions of the dorsal hippocampus disrupt renewal of conditional fear after extinction. *Learn Mem* 12:270-6
- Ji J, Maren S. 2007. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus* 17:749-58
- Judge ME, Quartermain D. 1982. Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiol Behav* 28:585-90
- Kamprath K, Wotjak CT. 2004. Nonassociative learning processes determine expression and extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 11:770-86
- Kelly A, Laroche S, Davis S. 2003. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354-60
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. 2005. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62:617-27
- Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB. 1995. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 52:1048-60
- Kida S, Josselyn SA, Pena de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, et al. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-55
- Kindt M, Soeter M, Vervliet B. 2009. Beyond extinction: erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nat Neurosci* 12:256-8
- Kitayama N, Vaccarino V, Kutner M, Weiss P, Bremner JD. 2005. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 88:79-86
- Koenigs M, Grafman J. 2009. Posttraumatic stress disorder: the role of medial prefrontal cortex and amygdala. *Neuroscientist* 15:540-8
- Kroon JA, Carobrez AP. 2009. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol Learn Mem* 91:32-40

- Lamprecht R, Dracheva S, Assoun S, LeDoux JE. 2009. Fear conditioning induces distinct patterns of gene expression in lateral amygdala. *Genes Brain Behav* 8:735-43
- Langer SZ. 1980. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 32:337-62
- Languille S, Davis S, Richer P, Alcacer C, Laroche S, Hars B. 2009. Extracellular signal-regulated kinase activation is required for consolidation and reconsolidation of memory at an early stage of ontogenesis. *Eur J Neurosci* 30:1923-30
- Lattal KM, Abel T. 2004. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4667-72
- Laurent V, Westbrook RF. 2009. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learn Mem* 16:520-9
- LeDoux J. 1998. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-38
- LeDoux J. 2003. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23:727-38
- LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-84
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-43
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26:10051-6
- Lewis DJ. 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86:1054-83
- Likhtik E, Popa D, Apergis-Schoute J, Fidacaro GA, Pare D. 2008. Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature* 454:642-5
- Lu KT, Walker DL, Davis M. 2001. Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *J Neurosci* 21:RC162
- Mactutus CF, Concannon JT, Riccio DC. 1982. Nonmonotonic age changes in susceptibility to hypothermia-induced retrograde amnesia in rats. *Physiol Behav* 28:939-43

- Mactutus CF, Riccio DC, Ferek JM. 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science* 204:1319-20
- Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, et al. 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* 29:402-13
- Manion ST, Gamble EH, Li H. 2007. Prazosin administered prior to inescapable stressor blocks subsequent exaggeration of acoustic startle response in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86:559-65
- Maren S. 2005. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* 47:783-6
- Maroun M, Akirav I. 2009. Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Learn Mem* 16:243-7
- Maroun M, Richter-Levin G. 2003. Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway in vivo. *J Neurosci* 23:4406-9
- Marshall RD, Beebe KL, Oldham M, Zaninelli R. 2001. Efficacy and safety of paroxetine treatment for chronic PTSD: a fixed-dose, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 158:1982-8
- Masand PS. 2003. Tolerability and adherence issues in antidepressant therapy. *Clin Ther* 25:2289-304
- McDonald AJ, Mascagni F, Guo L. 1996. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71:55-75
- McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-51
- McGaugh JL. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27:1-28
- McGhee LL, Maani CV, Garza TH, Desocio PA, Gaylord KM, Black IH. 2009. The effect of propranolol on posttraumatic stress disorder in burned service members. *J Burn Care Res* 30:92-7
- McNally GP, Pigg M, Weidemann G. 2004. Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 24:6912-9



- McNally RJ. 2007. Mechanisms of exposure therapy: how neuroscience can improve psychological treatments for anxiety disorders. *Clin Psychol Rev* 27:750-9
- McSweeney FK, Swindell S. 2002. Common processes may contribute to extinction and habituation. *J Gen Psychol* 129:364-400
- Milad MR, Quirk GJ. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420:70-4
- Milad MR, Rauch SL, Pitman RK, Quirk GJ. 2006. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol Psychol* 73:61-71
- Miracle AD, Brace MF, Huyck KD, Singler SA, Wellman CL. 2006. Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem* 85:213-8
- Miranda MA, Ferry B, Ferreira G. 2007. Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 88:260-3
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160:554-5
- Morgan JJ, Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-51
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE. 1993. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 163:109-13
- Morris RW, Bouton ME. 2007. The effect of yohimbine on the extinction of conditioned fear: a role for context. *Behav Neurosci* 121:501-14
- Mueller D, Cahill SP. Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy. *Behav Brain Res* 208:1-11
- Mueller D, Porter JT, Quirk GJ. 2008. Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *J Neurosci* 28:369-75
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE. 1997. Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* 111:683-91

- Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA. 2004. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* 117:131-43
- Myers KM, Davis M. 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36:567-84
- Myers KM, Davis M. 2007. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12:120-50
- Myers KM, Ressler KJ, Davis M. 2006. Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learn Mem* 13:216-23
- Nadel L. 1987. A Brain Structure: The Hippocampus. *Science* 235:1682a
- Nader K. 2003. Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26:65-72
- Nader K, Hardt O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10:224-34
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-6
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-9
- Nemeroff CB, Bremner JD, Foa EB, Mayberg HS, North CS, Stein MB. 2006. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. *J Psychiatr Res* 40:1-21
- Neumeister A, Daher RJ, Charney DS. 2005. Anxiety disorders: noradrenergic neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*:205-23
- Norberg MM, Krystal JH, Tolin DF. 2008. A meta-analysis of D-cycloserine and the facilitation of fear extinction and exposure therapy. *Biol Psychiatry* 63:1118-26
- Oropeza VC, Mackie K, Van Bockstaele EJ. 2007. Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex. *Brain Res* 1127:36-44
- Orr SP, Milad MR, Metzger LJ, Lasko NB, Gilbertson MW, Pitman RK. 2006. Effects of beta blockade, PTSD diagnosis, and explicit threat on the extinction and retention of an aversively conditioned response. *Biol Psychol* 73:262-71
- Ouyang M, Thomas SA. 2005. A requirement for memory retrieval during and after long-term extinction learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9347-52

- Pare D, Quirk GJ, Ledoux JE. 2004. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1-9
- Pedreira ME, Maldonado H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863-9
- Pieribone VA, Nicholas AP, Dagerlind A, Hokfelt T. 1994. Distribution of alpha 1 adrenoceptors in rat brain revealed by in situ hybridization experiments utilizing subtype-specific probes. *J Neurosci* 14:4252-68
- Pohl R, Rainey J, Ortiz A, Balon R, Singh H, Berchou R. 1985. Isoproterenol-induced anxiety states. *Psychopharmacol Bull* 21:424-7
- Pohl R, Yeragani VK, Balon R, Rainey JM, Lycaki H, et al. 1988. Isoproterenol-induced panic attacks. *Biol Psychiatry* 24:891-902
- Poldrack RA, Packard MG. 2003. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia* 41:245-51
- Powers MB, Smits JA, Otto MW, Sanders C, Emmelkamp PM. 2009. Facilitation of fear extinction in phobic participants with a novel cognitive enhancer: a randomized placebo controlled trial of yohimbine augmentation. *J Anxiety Disord* 23:350-6
- Prado-Alcala RA, Diaz del Guante MA, Garin-Aguilar ME, Diaz-Trujillo A, Quirarte GL, McGaugh JL. 2006. Amygdala or hippocampus inactivation after retrieval induces temporary memory deficit. *Neurobiol Learn Mem* 86:144-9
- Przybylski J, Roullet P, Sara SJ. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623-8
- Przybylski J, Sara SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241-6
- Quirk GJ, Mueller D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56-72
- Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K. 2000. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. *J Neurosci* 20:6225-31
- Rainbow TC, Parsons B, Wolfe BB. 1984. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1585-9

- Raskind MA, Dobie DJ, Kanter ED, Petrie EC, Thompson CE, Peskind ER. 2000. The alpha1-adrenergic antagonist prazosin ameliorates combat trauma nightmares in veterans with posttraumatic stress disorder: a report of 4 cases. *J Clin Psychiatry* 61:129-33
- Raskind MA, Peskind ER, Hoff DJ, Hart KL, Holmes HA, et al. 2007. A parallel group placebo controlled study of prazosin for trauma nightmares and sleep disturbance in combat veterans with post-traumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 61:928-34
- Raskind MA, Peskind ER, Kanter ED, Petrie EC, Radant A, et al. 2003. Reduction of nightmares and other PTSD symptoms in combat veterans by prazosin: a placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 160:371-3
- Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. 1988. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6301-5
- Rescorla RA. 2004. Spontaneous recovery. *Learn Mem* 11:501-9
- Ressler KJ, Rothbaum BO, Tannenbaum L, Anderson P, Graap K, et al. 2004. Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Arch Gen Psychiatry* 61:1136-44
- Resstel LB, Correa FM, Guimaraes FS. 2008. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:2027-35
- Resstel LB, Fernandes KB, Correa FM. 2005. alpha-Adrenergic and muscarinic cholinergic receptors are not involved in the modulation of the parasympathetic baroreflex by the medial prefrontal cortex in rats. *Life Sci* 77:1441-51
- Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM. 2006. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143:377-85
- Richter-Levin G, Maroun M. Stress and Amygdala Suppression of Metaplasticity in the Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*
- Riekkinen M, Stefanski R, Kuitunen J, Riekkinen P, Jr. 1996. Effects of combined block of alpha 1-adrenoceptors and NMDA receptors on spatial and passive avoidance behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 300:9-16

- Robbins TW. 1984. Cortical noradrenaline, attention and arousal. *Psychol Med* 14:13-21
- Rocher C, Spedding M, Munoz C, Jay TM. 2004. Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex* 14:224-9
- Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. 2009. The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* 32:289-313
- Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D, Quirk GJ. 2009. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biol Psychiatry* 65:887-92
- Rogan MT, Leon KS, Perez DL, Kandel ER. 2005. Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. *Neuron* 46:309-20
- Rogawski MA, Aghajanian GK. 1982. Activation of lateral geniculate neurons by locus coeruleus or dorsal noradrenergic bundle stimulation: selective blockade by the alpha 1-adrenoceptor antagonist prazosin. *Brain Res* 250:31-9
- Rosenberg LB. 2007. Necessary forgetting: on the use of propranolol in post-traumatic stress disorder management. *Am J Bioeth* 7:27-8
- Rothbaum BO, Davis M. 2003. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. *Ann N Y Acad Sci* 1008:112-21
- Roullet P, Sara S. 1998. Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plast* 6:63-8
- Rudy JW, O'Reilly RC. 1999. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav Neurosci* 113:867-80
- Santini E, Ge H, Ren K, Pena de Ortiz S, Quirk GJ. 2004. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 24:5704-10
- Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84
- Sara SJ, Roullet P, Przybylski J. 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn Mem* 6:88-96
- Schafe GE, Doyere V, LeDoux JE. 2005. Tracking the fear engram: the lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 25:10010-4

- Schneider AM, Sherman W. 1968. Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science* 159:219-21
- Sevelinges Y, Desgranges B, Ferreira G. 2009. The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory. *Learn Mem* 16:235-42
- Shin LM, Rauch SL, Pitman RK. 2006. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071:67-79
- Shin LM, Whalen PJ, Pitman RK, Bush G, Macklin ML, et al. 2001. An fMRI study of anterior cingulate function in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 50:932-42
- Sigurdsson T, Doyere V, Cain CK, LeDoux JE. 2007. Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52:215-27
- Sirvio J, MacDonald E. 1999. Central alpha1-adrenoceptors: their role in the modulation of attention and memory formation. *Pharmacol Ther* 83:49-65
- Smith C, Teitler M. 1999. Beta-blocker selectivity at cloned human beta 1- and beta 2-adrenergic receptors. *Cardiovasc Drugs Ther* 13:123-6
- Sotres-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE. 2006. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 60:329-36
- Southwick SM, Bremner JD, Rasmusson A, Morgan CA, 3rd, Arnsten A, Charney DS. 1999. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 46:1192-204
- Stein DJ, Davidson J, Seedat S, Beebe K. 2003. Paroxetine in the treatment of post-traumatic stress disorder: pooled analysis of placebo-controlled studies. *Expert Opin Pharmacother* 4:1829-38
- Stern CA, Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2008. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 90:545-50
- Sullivan RM, Gratton A. 2002. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27:99-114

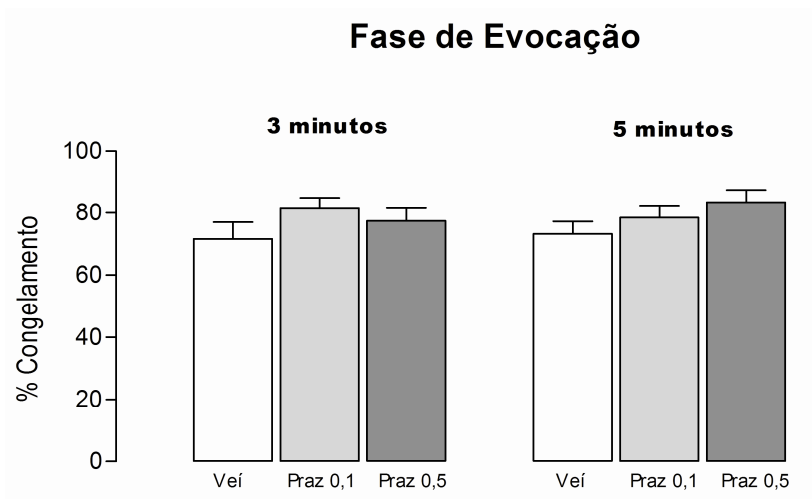
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-95
- Takahashi H. 2007. New insights into the therapeutic management of morning hypertension with alpha1-adrenergic receptor blockers. *Hypertens Res* 30:1011-3
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4:813-8
- Taubenfeld SM, Riceberg JS, New AS, Alberini CM. 2009. Preclinical assessment for selectively disrupting a traumatic memory via postretrieval inhibition of glucocorticoid receptors. *Biol Psychiatry* 65:249-57
- Taylor F, Raskind MA. 2002. The alpha1-adrenergic antagonist prazosin improves sleep and nightmares in civilian trauma posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychopharmacol* 22:82-5
- Taylor HR, Freeman MK, Cates ME. 2008. Prazosin for treatment of nightmares related to posttraumatic stress disorder. *Am J Health Syst Pharm* 65:716-22
- Teich AH, McCabe PM, Gentile CC, Schneiderman LS, Winters RW, et al. 1989. Auditory cortex lesions prevent the extinction of Pavlovian differential heart rate conditioning to tonal stimuli in rabbits. *Brain Res* 480:210-8
- Tollenaar MS, Elzinga BM, Spinhoven P, Everaerd W. 2009a. Immediate and prolonged effects of cortisol, but not propranolol, on memory retrieval in healthy young men. *Neurobiol Learn Mem* 91:23-31
- Tollenaar MS, Elzinga BM, Spinhoven P, Everaerd W. 2009b. Psychophysiological responding to emotional memories in healthy young men after cortisol and propranolol administration. *Psychopharmacology (Berl)* 203:793-803
- Tronel S, Sara SJ. 2002. Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* 9:105-11
- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262-75
- Vaiva G, Ducrocq F, Jezequel K, Averland B, Lestavel P, et al. 2003. Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. *Biol Psychiatry* 54:947-9

- van Stegeren AH. 2008. The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychol (Amst)* 127:532-41
- Verberne AJ. 1996. Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. *Am J Physiol* 270:R713-9
- Vertes RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58
- Vianna DM, Landeira-Fernandez J, Brandao ML. 2001. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. *Neurosci Biobehav Rev* 25:711-9
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ. 2006. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13:728-33
- Waddell J, Morris RW, Bouton ME. 2006. Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. *Behav Neurosci* 120:324-36
- Walker DL, Ressler KJ, Lu KT, Davis M. 2002. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J Neurosci* 22:2343-51
- Wallukat G. 2002. The beta-adrenergic receptors. *Herz* 27:683-90
- Wang SH, de Oliveira Alvares L, Nader K. 2009. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci* 12:905-12
- Westbrook RF, Iordanova M, McNally G, Richardson R, Harris JA. 2002. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: two roles for context. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 28:97-110
- Wrubel KM, Barrett D, Shumake J, Johnson SE, Gonzalez-Lima F. 2007. Methylene blue facilitates the extinction of fear in an animal model of susceptibility to learned helplessness. *Neurobiol Learn Mem* 87:209-17
- Yadin E, Thomas E, Grishkat HL, Strickland CE. 1993. The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol Behav* 53:1077-83
- Yehuda R, LeDoux J. 2007. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron* 56:19-32

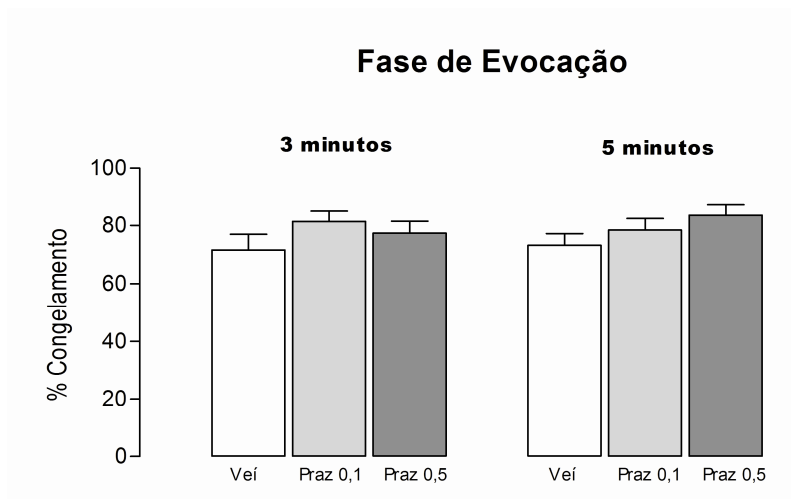


- Zarrindast MR, Hadi M, Homayoun H, Postami P, Shafaghi B, Khavandgar S. 2002. The role of alpha-adrenoceptors in the amnestic effect of intracerebroventricular dexamethasone. *Pharmacol Res* 46:339-44
- Zatzick DF, Marmar CR, Weiss DS, Browner WS, Metzler TJ, et al. 1997. Posttraumatic stress disorder and functioning and quality of life outcomes in a nationally representative sample of male Vietnam veterans. *Am J Psychiatry* 154:1690-5

## 8. APÊNDICE

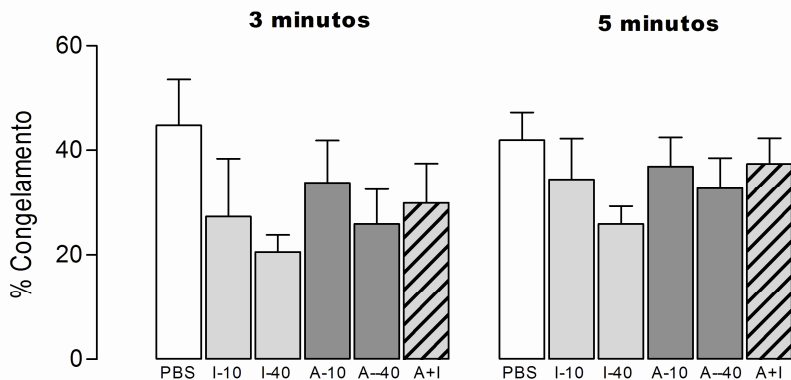


**Figura I.** Efeitos da administração aguda de salina (Sal; controle), isoproterenol (Iso; 2,5 mg/kg IP) ou propranolol (Prop; 10 mg/kg IP), 30 minutos antes da sessão de evocação do medo condicionado contextual, na porcentagem do tempo de congelamento em ratos re-expostos ao contexto por três ou cinco minutos. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9 por grupo).



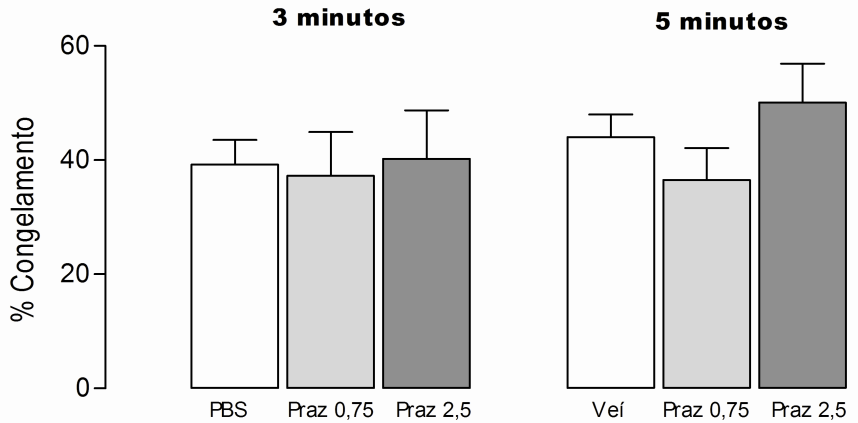
**Figura II.** Efeitos da administração aguda de veículo (Veí; controle), prazosin (praz) 0,1 mg/Kg ou prazosin 0,5 mg/Kg, 30 minutos antes da sessão de evocação do medo condicionado contextual, na porcentagem do tempo de congelamento em ratos re-expostos ao contexto por três ou cinco minutos. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9 por grupo).

## Fase de Evocação



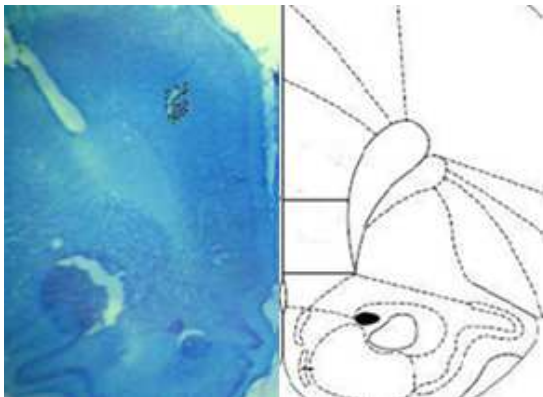
**Figura III.** Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle), isoproterenol (I; 10 ou 40 nmol), atenolol (A; 10 ou 40 nmol) ou atenolol + isoproterenol (A+I; 10 minutos intercalados), dez minutos antes da sessão de evocação do medo condicionado contextual, na porcentagem do tempo de congelamento em ratos re-expostos ao contexto por três ou cinco minutos. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 7-9 por grupo).

## Fase de Evocação

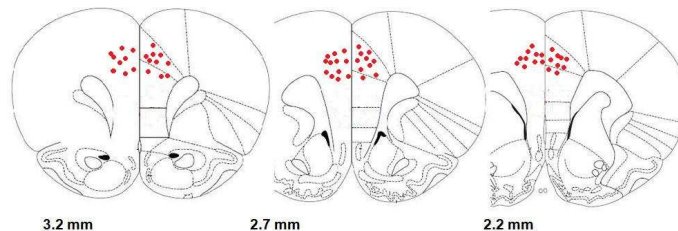


**Figura IV.** Efeitos da microinjeção intra-CPFvm de PBS (controle), prazosin (Praz) 0,75 nmol ou prazosin 2,5 nmol, dez minutos antes da sessão de evocação do medo condicionado contextual, na porcentagem do tempo de congelamento em ratos re-expostos ao contexto por três ou cinco minutos. Os valores obtidos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (N= 9-12 por grupo).

A

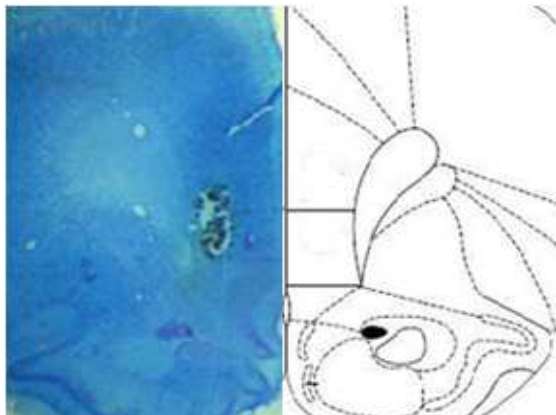


B

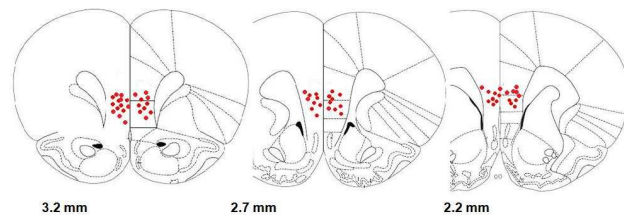


**Figura V.** A) Fotomicrografia do CPFdm mostrando o local da microinjeção após a administração do corante azul de Evans. B) Representação esquemática em secções coronais do CPF (3,2; 2,7 e 2,2 mm rostral ao bregma) mostrando os sítios de microinjeção no CPFdm de acordo com o atlas de rato (Paxinos & Watson 1998).

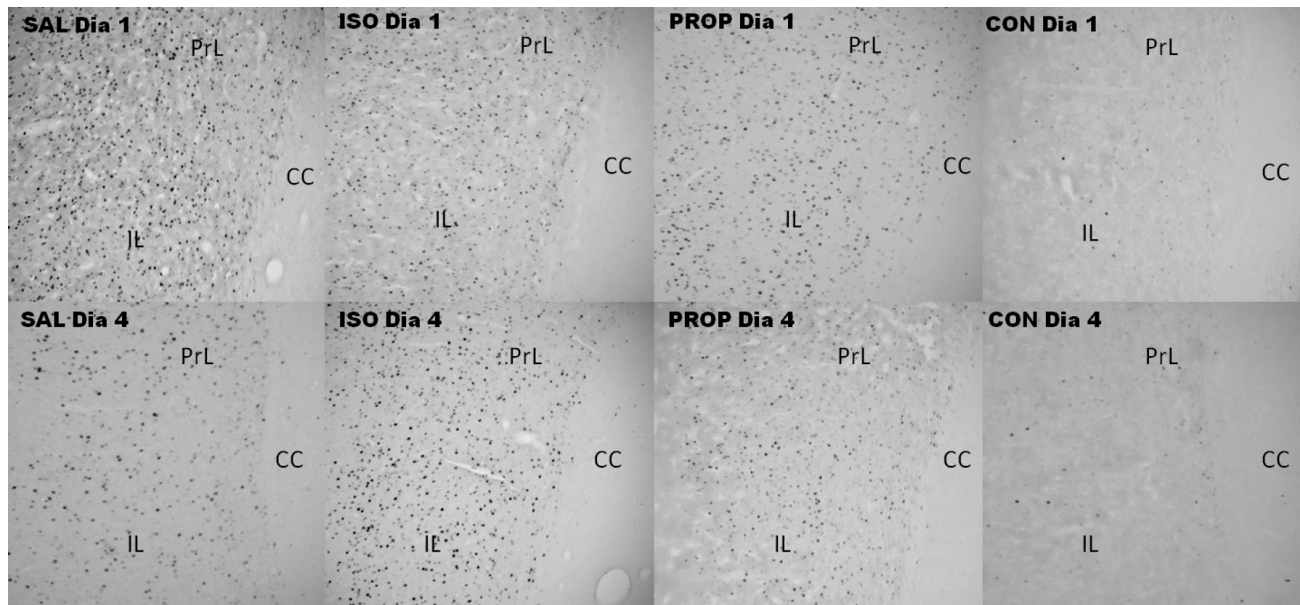
A



B



**Figura VI.** A) Fotomicrografia do CPFvm mostrando o local da microinjeção após a administração do corante azul de Evans. B) Representação esquemática em secções coronais do CPF (3,2; 2,7 e 2,2 mm rostral ao bregma) mostrando os sítios de microinjeção no CPFvm de acordo com o atlas de rato (Paxinos & Watson 1998).



**Figura VII.** Fotomicrografia do CPFvm mostrando a expressão de proteína Fos após a primeira e a quarta sessão de extinção nos grupos controle e tratados com injeções repetidas de salina, isoproterenol ou propranolol.



DROGAS	AQUISIÇÃO DA EXTINÇÃO			CONSOLIDAÇÃO DA EXTINÇÃO		RECONSOLIDAÇÃO		
	Sistêmica Única	Sistêmica Repetida	Intra-CPFvm	Sistêmica Repetida	Intra-CPFvm	Sistêmica Única	Intra-CPFdm	Intra-CPFvm
Isoproterenol	0	0	↑	↑	0	—	—	—
Propranolol	0	↓	—	↓	—	0	—	—
Prazosin	—	↓	↓	0	0	↓	0	↓
Atenolol	—	—	↓	—	0	—	—	—

**Tabela I.** Resumos dos efeitos ocasionados pela administração sistêmica única ou repetida ou intra-CPFm de compostos noradrenérgicos nas etapas de aquisição da extinção, consolidação da extinção e reconsolidação.



